

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIO DE LA FRACCIÓN PROTEICA DE QUESOS
DE LECHE DE DIFERENTES ESPECIES
MEDIANTE TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS Y CROMATOGRÁFICAS
Y SU COMBINACIÓN CON TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

ELENA MOLINA HERNÁNDEZ
MADRID, 1997

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DPTO. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**ESTUDIO DE LA FRACCIÓN PROTEICA EN QUESOS
DE LECHE DE DIFERENTES ESPECIES
MEDIANTE TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS Y CROMATOGRÁFICAS
Y SU COMBINACIÓN CON TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS**

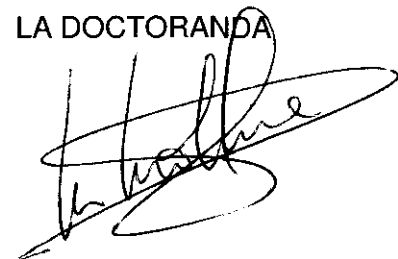
MEMORIA PRESENTADA POR
ELENA MOLINA HERNÁNDEZ

PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
POR LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

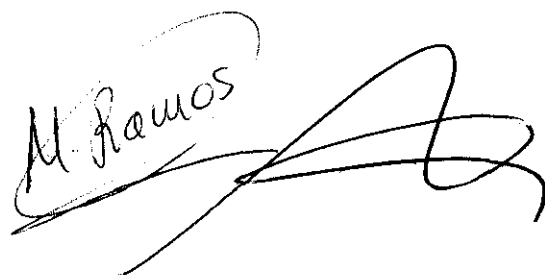
DIRECTORAS:

DRA. MERCEDES RAMOS. INSTO. FERMENTACIONES INDUSTRIALES, CSIC.
DRA. MERCEDES DE FRUTOS. INSTO. QUÍMICA ORGÁNICA GENERAL, CSIC.

LA DOCTORANDA



Vº Bº LAS DIRECTORAS



Esta tesis ha sido realizada en el Instituto de Fermentaciones Industriales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) bajo la dirección de la Dra. Mercedes Ramos, Profesora de Investigación de dicho Instituto, y la Dra. Mercedes de Frutos, Colaboradora Científica del Instituto de Química Orgánica General. Quiero agradecerles no sólo mi formación investigadora, sino también el entusiasmo transmitido, su apoyo y dedicación en estos años.

Agradezco al Dr. Jesús Pérez Gil, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica de la Universidad Complutense de Madrid, tutor de esta tesis, su interés, disponibilidad y ayuda prestada en todos los aspectos de esta tesis.

Quiero expresar mi reconocimiento a la Dra. Carmen Polo, Directora del Instituto de Fermentaciones Industriales (IFI), por sus valiosas sugerencias en aspectos profesionales y personales.

Al Dr. Pedro J. Martín Álvarez, Investigador Científico del IFI, agradezco su valiosa contribución en el tratamiento estadístico de los datos, pero sobre todo, su generosidad al compartir sus conocimientos, su amistad e incluso su espacio.

El interés, la orientación y estímulo de los Doctores Lourdes Amigo, Rosina López-Fandiño, Gloria López-Gálvez, Guillermo Santa-María y Agustín Olano, ha supuesto un importante incentivo. También agradezco el cariño de María José Rodríguez y la ayuda de la Dra. Encarnación Pueyo, Titulado Técnico, que además ha demostrado ser una gran compañera. Tengo que agradecer a Constanza Talavera, Ayudante de Laboratorio, su inestimable apoyo técnico y muy especialmente a Consti su valiosa amistad.

A la Dra. Victoria Moreno, al Dr. Javier Señoráns y a la Dra. Mercedes de Frutos les agradezco el privilegio de haber pasado tantas horas juntos y la mayoría buenas. A todos mis compañeros del laboratorio, Mónica, Chelo, Begoña, Beatriz, Antonia, Josefina, Adolfo, Inés, Alicia y otros que ya no están, Marisi, Laura, Vicente, David, Álvaro y Marisa, por la desinteresada ayuda prestada y los buenos ratos que pasamos, a los que han contribuido los demás compañeros del Instituto.

Mi reconocimiento al Instituto de Química Orgánica (IQO), en particular a todo el personal del Departamento de Análisis, por brindarme su ayuda y especialmente al Dr. José Carlos Díez-Masa, por contribuir a mi formación científica y mostrarme la importancia de la ilusión y la tenacidad en la investigación. Al Dr. Alejandro Cifuentes por su enseñanza de la electroforesis capilar y ayuda incondicional, y sobre todo, por su sentido del humor y carisma.

Agradezco a la Fundación Española de Industrias Lácteas (FESLAC) y al CSIC las becas concedidas.

Al Laboratoire de Recherches sur les Arômes de Dijon, Francia, agradecerles su grata acogida y las facilidades ofrecidas, especialmente a los doctores Christian Salles y Jean-Luc le Queré y a Denise Demazières y Chantal Septier.

Agradezco al Instituto de Fermentaciones Industriales las facilidades ofrecidas, y a D. José Luis Andreu, D. Antonio López Marugán, Dña. Angelines González, y Dña. María Luisa Mulas, que hayan solucionado gustosamente numerosos problemas. También a todas aquellas personas del IFI, del IQO y del Centro de Química Orgánica que han contribuido de una forma u otra a la realización de esta tesis.

Finalmente deseo agradecer a mi familia y amigos su constante estímulo y apoyo sin los cuales no podría haber completado este trabajo. Y a Antonio, quiero dedicarle esta tesis, que para mi constituye una gran satisfacción, por haber compartido por igual los esfuerzos y las recompensas que supone un trabajo como éste.

Madrid, 1997

RESUMEN

El estudio realizado, que queda recogido en la presente memoria, ha abordado el análisis de las fracciones soluble (seroproteínas) e insoluble (caseínas) a pH 4.6 de las proteínas de leche y queso de diferentes especies.

En la primera parte del trabajo se ha llevado a cabo la caracterización de la fracción caseínica de leche y quesos de leche pura de vaca, oveja y cabra mediante técnicas electroforéticas en gel, mono y bidimensionales, y electroforesis capilar. Se han obtenido perfiles característicos para cada una de las especies habiéndose identificado en ellos numerosos componentes caseínicos y sus productos de degradación por acción del cuajo y la plasmina.

La segunda parte del trabajo ha estado dedicada al estudio de la fracción de proteínas de suero. Ya que la fracción seroproteica del queso es más simple que la fracción caseínica, se ha elegido la primera para su utilización para la determinación del porcentaje de leche de cada una de las especies en quesos de mezcla. Para ello se han comparado diferentes técnicas de regresión multivariante aplicadas a los resultados obtenidos por isoelectroenfoque, siendo posible realizar la predicción de los porcentajes de cada una de las leches que intervienen en la composición del queso con errores medios en predicción en torno al 6%.

La fracción de seroproteínas de leche ha sido analizada mediante electroforesis capilar con un método, cuya puesta a punto ha permitido cuantificar las proteínas mayoritarias de suero lácteo en leche de vacas de diferentes razas, demostrando que el mayor contenido en seroproteínas está asociado con el alelo A de β -lactoglobulina.

En la siguiente etapa del trabajo se han empleado dos técnicas de alta resolución, como son la cromatografía de líquidos de alta eficacia y la

electroforesis capilar, que proporcionan informaciones complementarias para la caracterización de la fracción de peso molecular inferior a 10 000 D de nitrógeno soluble en agua de quesos de leche de vaca, oveja y cabra. De este modo ha sido posible asignar picos de la misma naturaleza en las fracciones nitrogenadas correspondientes a cada especie. En la fracción de peso molecular inferior a 1000 D de nitrógeno soluble en agua de queso de oveja, la combinación de análisis sensorial con la determinación de la concentración de aminoácidos libres y de diferentes iones en las distintas subfracciones obtenidas por cromatografía de gel permeación, han permitido correlacionar la composición química con el aroma y sabor del queso.

Por último, se han desarrollado métodos de elevada selectividad y sensibilidad, que permiten la detección de porcentajes inferiores al 1% de leche de vaca añadida a quesos de leche de oveja, cabra, búfala o sus mezclas. Como indicador de la presencia de leche de vaca, se elige la β -lactoglobulina bovina, que se determina en forma nativa en la fracción sérica, con límite de detección de 10 μg en 1 litro de leche, o incorporada a la fracción caseínica en forma desnaturalizada con sensibilidad 5 veces menor. Estos métodos emplean conjuntamente técnicas de separación y de inmunorreconocimiento con el fin de eliminar las limitaciones que tienen cada uno de los métodos cuando se emplean de forma individual.

ÍNDICE

OBJETIVO GENERAL Y PLAN DE TRABAJO	1
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. LECHE Y QUESO DE OVEJA, VACA Y CABRA	7
1.2. COMPOSICIÓN GLOBAL DE LA LECHE DE OVEJA, VACA Y CABRA	10
1.3. PROTEÍNAS LÁCTEAS	11
1.4. PROTEOLISIS DURANTE LA MANUFACTURA Y MADURACIÓN DEL QUESO	15
1.4.1. Coagulación enzimática de la leche	15
1.4.2. Modificaciones de las proteínas lácteas durante la maduración	16
1.4.3. Caracterización de la fracción peptídica de quesos	17
1.5. DETECCIÓN DEL ORIGEN DE LA LECHE EMPLEADA EN LA ELABORACIÓN DEL QUESO	19
1.5.1. Técnicas electroforéticas	20
1.5.2. Técnicas cromatográficas	23
1.5.3. Técnicas inmunológicas	24
1.5.4. Técnicas estadísticas	27
2. MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN CASEÍNICA DE LECHE Y QUESO DE OVEJA, VACA Y CABRA.	33
2.1.1. Muestras de leche	33
2.1.2. Muestras de queso	33
2.1.3. Obtención de las caseínas	37
☐ Tratamiento con plasmina	37
2.1.4. Técnicas electroforéticas	37
☐ PAGE-urea a pH alcalino	37
☐ Isoelectroenfoque en geles ultrafinos	39
☐ Electroforesis bidimensional	40
☐ Métodos de tinción y secado	40
☐ Electroforesis capilar	41

2.2. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN SEROPROTEICA DE LECHE Y QUESO DE OVEJA, VACA Y CABRA.	41
2.2.1. Muestras de leche	41
2.2.2. Muestras de queso	41
2.2.3. Obtención de las proteínas de suero	42
2.2.4. Técnicas electroforéticas	43
☐ Isoelectroenfoque en PhastSystem®	43
☐ Métodos de tinción, secado y análisis de imagen	44
☐ Electroforesis capilar	44
2.2.5. Técnicas estadísticas	44
2.3. FRACCIONAMIENTO Y ANÁLISIS DE PÉPTIDOS EN QUESOS DE OVEJA, VACA Y CABRA.	46
2.3.1. Muestras de queso	46
2.3.2. Obtención y análisis de fracciones peptídicas de $P_m < 10\,000\text{ D}$	47
☐ Análisis de péptidos por cromatografía de líquidos	47
☐ Análisis de péptidos por electroforesis capilar	48
2.3.3. Obtención y análisis de fracciones peptídicas de $P_m < 1\,000\text{ D}$	49
☐ Determinación de iones	51
☐ Análisis de péptidos por HPLC	51
☐ Análisis de aminoácidos por HPLC	51
2.4. EMPLEO CONJUNTO DE TÉCNICAS DE SEPARACIÓN Y MÉTODOS INMUNOLÓGICOS PARA ANÁLISIS DE CANTIDADES TRAZA DE PROTEÍNAS DE SUERO NATIVAS Y DESNATURALIZADAS	53
2.4.1. Muestras de leche	53
2.4.2. Muestras de queso	53
☐ Quesos con leche pasteurizada de vaca añadida	54
☐ Quesos con leche UHT de vaca añadida	54
☐ Quesos con proteína desnaturalizada de leche de vaca añadida	54
☐ Cuajadas con 0 y 1% de leche de vaca añadida	54

	Índice
2.4.3. Aislamiento de las proteínas de suero del queso	55
☐ Proteínas de suero nativas	55
☐ Proteínas de suero desnaturalizadas	55
2.4.4. Aislamiento de las caseínas del queso	55
2.4.5. Isoelectroenfoque en geles ultrafinos	55
2.4.6. Inmunocromatografía	55
2.4.7. Western Blotting	58
☐ Separaciones electroforéticas previas a la transferencia	58
☐ Transferencia y reconocimiento inmunológico	61

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN CASEÍNICA DE LECHE Y QUESO DE OVEJA, VACA Y CABRA	63
3.1.1. Técnicas electroforéticas bidimensionales	63
3.1.2. Electroforesis capilar (CE)	63
3.1.3. Sistemas modelo de las caseínas de leche y queso de oveja y cabra	67

3.2. CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN SEROPROTEICA DE LECHE Y QUESO DE OVEJA, VACA Y CABRA. 73

3.2.1. Aplicación de técnicas estadísticas a la determinación de altos porcentajes de leche de oveja, vaca y cabra en quesos de mezcla.	
☐ Isoelectroenfoque	73
☐ Regresión lineal	75
☐ Regresión multivariante	80
☐ Aplicación de las distintas técnicas de regresión a la determinación de los porcentajes de leche de vaca, oveja y cabra en un queso elaborado con leche ultrafiltrada	86
3.2.2. Estudio de la fracción seroproteica de leche por electroforesis capilar	91

❑ Selección de las condiciones experimentales	91
❑ Contenido en β -lactoglobulina A y B y α -lactoalbúmina de leche de vaca por electroforesis capilar	98
❑ Estudio de los perfiles electroforéticos de leche de oveja, vaca y cabra	104
3.3. FRACCIONAMIENTO Y ESTUDIO DE PÉPTIDOS EN QUESOS DE OVEJA, VACA Y CABRA.	106
3.3.1. Análisis de la fracción peptídica de peso molecular inferior a 10 000 D.	106
❑ Fraccionamiento por peso molecular e hidrofobicidad	106
❑ Análisis mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia y electroforesis capilar, de las diferentes fracciones obtenidas	110
3.3.2. Análisis de la fracción peptídica de peso molecular menor a 1 000 D.	
❑ Fraccionamiento por GPC	115
❑ Análisis de las fracciones obtenidas por cromatografía de gel permeación	117
3.4. EMPLEO CONJUNTO DE TÉCNICAS DE SEPARACIÓN Y MÉTODOS INMUNOLÓGICOS PARA ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DE SUERO NATIVAS Y DESNATURALIZADAS	
3.4.1. Inmunocromatografía	124
❑ Construcción y empleo de la columna de anti- β -lactoglobulina purificado	124
3.4.2. Western blotting	128
❑ Especificidad el Western blotting	128
❑ Sensibilidad del método	130
❑ Detección de β -lactoglobulina nativa y desnaturalizada en quesos	132
4. CONCLUSIONES	145
5. BIBLIOGRAFÍA	149

OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

Las proteínas lácteas constituyen la fracción más compleja de la leche y la que mayor variabilidad presenta en las diferentes especies animales. El conocimiento preciso de la fracción proteica de la leche de vaca, oveja y cabra, va a permitir por una parte profundizar en el conocimiento básico de estas proteínas y por otro el estudio de adulteraciones en queso, ya sea la detección de pequeños porcentajes de leche de vaca añadida a quesos de leche de oveja y/o cabra, para garantizar su genuinidad, o bien la determinación de porcentajes elevados de leche de las tres especies en quesos elaborados con estos tipos de leche con el fin de garantizar composiciones especificadas en la legislación. En los últimos años ha habido un notable avance en el desarrollo de técnicas analíticas, que proporcionan información cualitativa y cuantitativa sobre la determinación del origen y procesado de la leche o sus derivados. Sin embargo, aún quedan problemas por resolver, como la detección de pequeños porcentajes de proteínas de suero nativas y desnaturalizadas y determinar los porcentajes de leche de mezclas de leche de vaca y cabra en quesos de oveja.

El objetivo general de este trabajo, es el estudio y caracterización de la fracción proteica de leches y quesos de vaca, oveja y cabra, o sus mezclas, mediante aplicación y desarrollo de técnicas analíticas de alta resolución: métodos electroforéticos, cromatográficos, y la combinación de ellos con técnicas inmunológicas.

Para conseguir el objetivo propuesto se ha desarrollado el siguiente plan de trabajo:

- Aplicación de técnicas electroforéticas para la caracterización de la fracción caseínica de la leche. Establecer las posibilidades que ofrece esta fracción para la determinación del origen de la leche utilizada en la fabricación de quesos.

Objetivo y plan de trabajo

- Comparación de distintas técnicas de regresión multivariante, principalmente análisis de regresión en componentes principales (PCR) y análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), aplicadas a resultados obtenidos por electroforesis de las proteínas de suero, para la determinación de porcentajes altos de leche de vaca, oveja y cabra en quesos de mezcla.
- Desarrollo de un método de electroforesis capilar, rápido y sensible, para la separación de proteínas de suero y su determinación cuantitativa.
- Estudio por técnicas cromatográficas y electroforéticas, de péptidos de bajo peso molecular de quesos de oveja, vaca y cabra como primera aproximación a la caracterización de la fracción peptídica. Estudio de la contribución de estos péptidos en el aroma y sabor de los quesos.
- Desarrollo de métodos de elevada sensibilidad, mediante combinación de técnicas de separación y técnicas inmunológicas para la detección de β -lactoglobulina bovina nativa y desnaturalizada en cantidades traza.

INTRODUCCIÓN

1.1. LECHE Y QUESO DE OVEJA, VACA Y CABRA

La producción mundial de leche en 1994 ascendió a 476 300 millones de Tm, siendo la leche de vaca la de mayor importancia, representando el 96.1% del total. Las leches de cabra y oveja sólo representan un 2.2% y un 1.7% respectivamente, del total producido en el mundo. La situación cambia si nos referimos a los datos de los países mediterráneos, siendo el total de producción lechera de 63 800 millones de Tm, de los cuales, la leche de vaca representa el 90.9%, pero los niveles de producción de leche de cabra y oveja empiezan a ser significativos, con un 3.1% y un 6% respectivamente. La **Tabla 1** refleja la evolución de la producción mundial y mediterránea durante el periodo 1987-1994.

Tabla 1. Evolución de la producción lechera (millones de toneladas)
(Datos del anuario de producción de la FAO)

	1987	1994
LECHE DE OVEJA		
Mundial	7 600	7 900
Mediterránea	3 700	3 800
LECHE DE CABRA		
Mundial	8 800	10 400
Mediterránea	2 100	2 000
LECHE DE VACA		
Mundial	466 000	458 000
Mediterránea	61 000	58 000

Una buena parte de la producción láctea se destina a la elaboración de quesos. Según la Federación Nacional de Industrias Lácteas (FENIL), en 1994 se produjeron en España 228 000 Tm de queso, de las que 69 900 Tm estaban elaboradas con leche de vaca, 14 800 Tm con leche de oveja y 7 300 Tm con leche de cabra. El resto corresponde a la producción de queso de

mezcla, que como se observa en la **Figura 1**, constituye una importante aportación a la producción quesera.

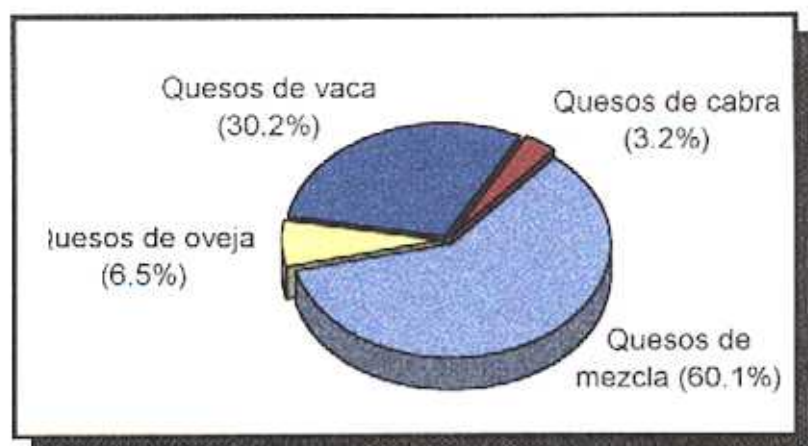


Figura 1: Producción de queso en España en 1994.

Existen numerosos tipos de quesos, clasificados según la materia prima y sus distintas formas de elaboración, dentro de los cuales se encuentran numerosas variedades fabricadas con leche pura de oveja, cabra o vaca, así como con mezclas de leche de dos y tres especies. Algunos de los quesos españoles de mezcla más representativos se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Quesos españoles de leche de vaca, oveja y cabra.

Mezcla oveja/vaca	Mezcla cabra/vaca	Mezcla oveja/cabra	Mezcla vaca/oveja/cabra
Anso-Hecho	Almería	Blanquet	Ahumada de Áliva
Burgos	Beyos	Casín	Cabrales
Cuayau	La Armada	Cassoleta	Gamonedo
Flor de Guía	Mato	Gomera	Genestoso
Mallorquín		Grazalema	Herreño
Mortera		Ibicenco	Peñamellera
Porrúa		La Nucia	Quesuco
Vidiago		La Calahorra	Picón
Villalón		Servilleta	Pido
		Tronchón	Tenerife

Algunos de los quesos fabricados con leche de oveja o cabra poseen denominación de origen, estando algunos de ellos, elaborados en zonas muy restringidas y con tradición de varios siglos. En España existen 8 quesos fabricados con leche de oveja o mezcla de oveja con cabra y/o vaca, con denominación de origen, incluidos en el Reglamento 1107/96 del DOCE del 21 del Junio de 1996, que son:

- Queso Manchego, de oveja. BOE 5-1-85
- Queso de Liébana, de oveja, cabra y vaca. BOE 14-10-87
- Queso Cabrales, de oveja, cabra y vaca. BOE 12-7-90
- Queso Roncal, de oveja. BOE 14-3-91
- Queso de la Serena, de oveja. BOE 27-4-93
- Queso Zamorano, de oveja. BOE 20-5-93
- Queso Idiazábal, de oveja. BOE 3-12-95
- Queso Majorero, de oveja y cabra. BOE 14-9-96

También existen en España, tres quesos con denominaciones genéricas, fabricados con leche de oveja, vaca y cabra, cuyos porcentajes mínimos están regulados por la legislación (BOE 27-7-87), estos quesos son:

- Queso Ibérico, con mínimos de leche de oveja, vaca y cabra de 10%, 50% y 30%, respectivamente.
- Queso Hispánico, 30% mínimo de leche de oveja y 50% mínimo de leche de vaca.
- Queso de la Mesta, con 75% y 15% mínimo de leche de oveja y vaca respectivamente.

1.2. COMPOSICIÓN GLOBAL DE LA LECHE DE OVEJA, VACA Y CABRA

La composición de la leche de distintas especies, viene condicionada por las necesidades nutricionales de la especie, pero en general la diferencia es de tipo cuantitativo, ya que las leches de distintas especies contienen, básicamente, los mismos constituyentes principales que son: agua, proteína, grasa, lactosa y minerales. En la **Tabla 3** se muestra la composición de leche de oveja, vaca y cabra, aunque hay que tener en cuenta que no sólo existen variaciones debidas a la especie, sino que dentro de cada una de ellas también hay variaciones en la composición debidas a factores genéticos, fisiológicos y ambientales.

Tabla 3. Composición global (expresado en %) de la leche de oveja, vaca y cabra.

	Oveja	Vaca	Cabra
Agua	81.58	87.48	87.10
Sólidos totales:	18.42	12.52	12.90
- Proteína:	5.8	3.3	3.4
Caseínas	4.64	2.64	2.45
Seroproteínas	1.16	0.66	0.95
- Grasa	7.1	3.8	4.1
- Lactosa	4.6	4.7	4.6
- Sales minerales	0.92	0.72	0.80

La leche de oveja y cabra ha sido objeto de menor número de estudios que la leche de vaca, aunque se han realizado grandes esfuerzos por recopilar datos sobre su composición y factores de variación y potenciar su estudio, que han sido publicados por Ramos y Juárez (1981, 1989), Núñez y col. (1989), Juárez y Ramos (1993) y Alichanides (1996).

La composición de la leche determina su valor nutritivo, su capacidad para ser utilizada como materia prima para productos lácteos y otros alimentos y muchas de las características físico-químicas y organolépticas de estos productos. La importancia nutricional del queso se debe entre otros factores, a su elevada concentración en proteínas, contribuyendo significativamente al aporte de aminoácidos. Aunque el consumo de leche líquida y otros productos lácteos está disminuyendo, hay un incremento en el consumo de queso en la mayoría de los países.

1.3. PROTEÍNAS LÁCTEAS

Las proteínas de la leche son probablemente las mejor caracterizadas de todas las proteínas de alimentos. Se conocen las estructuras primarias de todas las proteínas de la leche de vaca, e incluso las estructuras secundarias y terciarias de la mayor parte de las proteínas de suero.

Las leches ovina, bovina y caprina contienen 5.8%, 3.3% y 3.4% de proteína respectivamente, de las cuales el 80%, 80%, y 72% respectivamente, son insolubles a pH 4.6 a Tª 20 °C. Las proteínas insolubles en estas condiciones, se denominan caseínas y las solubles proteínas de suero o seroproteínas.

La leche de vaca contiene 4 **caseínas** principales específicas: α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN y κ -CN, así como derivados proteicos como las γ_1 -CN, γ_2 -CN y γ_3 -CN, que se producen por la acción proteolítica de la plasmina sobre la β -CN. Las leches de oveja y cabra también contienen α -CN, β -CN y κ -CN, con estructura y propiedades funcionales parecidas a las de la leche de vaca.

Una de las principales propiedades de las caseínas es el carácter anfótero de sus estructuras primarias, fundamentalmente las α_{s1} -CN, α_{s2} -CN y β -CN, debido a la fosforilación y al elevado contenido en residuos de serina y de treonina en sus dominios polares. Como resultado, la estructura terciaria de las caseínas está compuesta por dos dominios, uno hidrofóbico globular y otro polar muy

cargado. Los grupos fosfato y los residuos aminoacídicos, excepto en la α_{s1} -CN, están uniformemente distribuidos en la secuencia, hecho importante porque la secuencia reconocida para la fosforilación de la cadena proteica es preferentemente Ser/Thr-X-Glu/Ser P (Swaisgood, 1992) y esto provoca que las estructuras secundaria y terciaria de las caseínas sean abiertas y desordenadas.

La leche contiene 2 **proteínas de suero** principales: β -lactoglobulina (β -LG) y α -lactoalbúmina (α -LA), además de otras proteínas como la seroalbúmina, inmunoglobulinas, y lactoferrina, y un grupo de péptidos, que se incluyen entre las proteínas de suero por ser solubles a pH 4.6, y que son las proteosomas: PP5, PP8 lento y PP8 rápido. Estas proteosomas se forman por la acción proteolítica de la plasmina sobre la β -caseína. Las seroproteínas son globulares debido a la distribución uniforme de sus restos polares y no polares, a la ausencia de P y a su bajo contenido en prolina. Estas características unidas a un alto contenido en cistina, cisteína y metionina hacen que sean más inestables térmicamente que las caseínas, provocando la pérdida de solubilidad por calentamiento de la leche.

Las proteínas de suero se comportan como típicas proteínas globulares cuando se les somete a agentes desnaturizantes; son casi totalmente desnaturizadas por calor a 90 °C durante 10 minutos. Esta desnaturización provoca su agregación y precipitación sobre las micelas de caseínas, interaccionando con la κ -caseína y la α_s -caseína por puentes disulfuro intermoleculares. La formación del complejo β -lactoglobulina- κ -caseína es de gran importancia para la formación de la cuajada y la dureza de la misma.

La β -lactoglobulina es la proteína de suero mayoritaria, segregada en la leche de los rumiantes. Se presenta en la naturaleza como un dímero de dos subunidades monoméricas que no están unidas covalentemente. Cuando hay más de una variante genética forman híbridos. La α -lactoalbúmina es la

segunda proteína mayoritaria del suero lácteo. Tiene una configuración estable entre pH 5.4 y 9. Se ha comprobado que liga muy fuertemente dos átomos de Ca^{2+} , y que la eliminación de estos iones convierte a la α -lactoalbúmina en más sensible a la desnaturalización por calor o por agentes desnaturalizantes.

Cada una de las 6 proteínas principales de la leche (α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN, κ -CN, α -LA y β -LG), presentan microheterogeneidades que resultan de dos procesos diferentes: modificaciones post-traducción en la síntesis de estas proteínas, como puede ser la variabilidad en el grado de fosforilación (α_{s1} -CN, α_{s2} -CN) o en la glicosilación (κ -CN); o bien modificaciones durante la propia síntesis, posiblemente mutaciones, originando sustituciones de aminoácidos, controladas genéticamente, dando lugar a las denominadas **variantes genéticas**, presentes en las 6 proteínas principales de la leche. En leche de vaca se han identificado 30 variantes genéticas, α_{s1} -CN (A,B,C,D,E), α_{s2} -CN (A, B, C, D), β -CN (A1, A2, A3, B, C, D, E), κ -CN (A, B, C, E), β -LG (A, B, C, D, E, F, G), α -LA (A, B, C), conociéndose la localización exacta de las mutaciones. En leche de oveja se han identificado las siguientes variantes genéticas: α_{s1} -CN (A,B,C,D), α_{s2} -CN (A, B, C, Super-rápida), β -CN (1, 2), κ -CN (A, B), β -LG (A, B, C), α -LA (A, B). Y en leche de cabra se han identificado: α_{s1} -CN (A,B,C,D,E, F), α_{s2} -CN (A, B, C), β -CN (A, B), κ -CN (A, B), la β -LG y la α -LA de cabra son consideradas monomórficas.

En numerosos estudios, se muestran las posibles relaciones entre el polimorfismo genético de la leche y la tasa de producción de la misma, su composición y sus propiedades tecnológicas, en particular, la ya confirmada relación con las aptitudes para la coagulación en la fabricación de queso (Jakob, 1994). Por razones económicas obvias, la mayoría de los trabajos se refieren a leche de vaca, algunos a leche de cabra y aún son menos los que tratan de fraccionamiento y variantes genéticas de proteínas de oveja.

Hay que destacar otro tipo de polimorfismo genético de tipo cuantitativo, descubierto por primera vez en el locus de la α_{s1} -caseína caprina y que parece responsable de una gran variabilidad en el contenido de caseína en la leche, pues la modificación ocurrida en la síntesis de la proteína no se traduce en un cambio en la secuencia, sino en mayor o menor cantidad de proteína sintetizada (Mahé y Grosclaude, 1982).

La homología entre las proteínas de las tres especies (oveja, vaca y cabra) es mayor para las seroproteínas que para las caseínas, exactamente en el siguiente orden: β -LG > α -LA > α_{s1} -CN > α_{s2} -CN > β -CN > κ -CN. En la **Tabla 4** se muestra la longitud de las cadenas polipeptídicas de leche de oveja, vaca y cabra y las diferencias entre ellas.

Tabla 4. Número de aminoácidos de las seis proteínas principales de leche de oveja, vaca y cabra.

	VACA	CABRA	OVEJA	Número de residuos diferentes		
				V/C	V/O	C/O
α_{s1} -CN	199	199	191	24	25	6
α_{s2} -CN	207	208	208	27	25	4
β -CN	209		207		21	
κ -CN	169	171	171	25	27	8
α -LA	123	123	123	7	7	4
β -LG	170	170	170	7	6	1

1.4. PROTEOLISIS DURANTE LA MANUFACTURA Y MADURACIÓN DEL QUESO

La proteólisis es considerada por muchos autores como el proceso más importante en el desarrollo del sabor y la textura del queso, con la excepción de quesos azules y algunas variedades italianas, en las cuales dominan la lipólisis y la oxidación de los ácidos grasos, sin dejar de ser importante la proteólisis (Fox, 1989).

Durante la transformación de la leche en queso, tiene lugar un proceso de deshidratación en el cual la grasa y las proteínas se concentran de 6 a 10 veces, dependiendo de la variedad. Como se verá a continuación, la deshidratación se consigue en la mayoría de los quesos mediante una coagulación enzimática de la caseína. Posteriormente, las modificaciones producidas por las proteínas lácteas durante la maduración van a influir en gran manera en la textura, aroma y sabor del queso.

1.4.1. Coagulación enzimática de la leche

La coagulación de la leche inducida por el cuajo es un proceso en dos etapas. La primera fase corresponde a la ruptura enzimática de la κ -caseína, por acción del cuajo, que actúa sobre el enlace $\text{Phe}_{105} - \text{Met}_{106}$ y dando lugar a para- κ -caseína (que consiste en los 2/3 de la molécula anterior con el NH_2 terminal) fuertemente hidrófoba y poco soluble en agua y una familia de péptidos hidrofílicos (macropéptidos conteniendo cantidades variables de carbohidratos, que proceden del C-terminal). El pH óptimo para la hidrólisis de la κ -caseína se encuentra en el rango 5.1-5.5, pero este proceso también se ve influenciado por otros factores como la fuerza iónica, la temperatura, el grado de glicosilación de la κ -caseína y el tratamiento térmico de la leche.

Durante la segunda fase, no enzimática, las micelas de caseína en presencia de Ca^{2+} se van agregando en un gel a temperaturas superiores a 20 °C (Dalglish, 1987). La agregación no comienza hasta que el 85% de la κ -caseína total ha sido hidrolizada.

La interacción inducida por calor entre la κ -caseína y las proteínas de suero aumenta la duración de las fases de coagulación y si el tratamiento térmico es suficientemente severo, la leche no coagula. El retraso en la primera fase es debido a la unión de las proteínas de suero a la κ -caseína a través de puentes disulfuro. La segunda fase se ve influenciada al participar en la matriz del gel las proteínas de suero desnaturalizadas, aunque si las proteínas de suero han sido añadidas previamente a la leche, la coagulación no se ve afectada; ésta es la base del proceso de concentración del suero para incorporación de proteínas de suero al queso.

1.4.2. Modificaciones de las proteínas lácteas durante la maduración

La proteólisis es el fenómeno principal en el proceso de maduración del queso. Gracias a la degradación de las caseínas, que son los principales componentes estructurales de la cuajada, ésta pasa de ser relativamente insípida a transformarse en quesos con variadas texturas, aromas y sabores. Los péptidos y aminoácidos producidos a partir de las caseínas participan en la formación de componentes del sabor y aroma o en la de sus precursores (Engels y Visser, 1994). La proteólisis también desempeña un papel esencial en el desarrollo de la flora secundaria que dentro de sus requerimientos nutricionales incluye péptidos y aminoácidos.

Como consecuencia de la proteólisis, los compuestos nitrogenados insolubles inicialmente, presentes en el queso, pasan a formas solubles. En las primeras etapas de la proteólisis, las caseínas son degradadas a péptidos de elevado peso molecular, nunca inferior a 1400 D (O'Keefe y col., 1976), debido principalmente a la acción proteolítica del cuajo o sus sustitutos y sobre todo, a las proteinasas de los microorganismos que forman parte del cultivo iniciador y a las proteasas nativas de la leche. Posteriormente estos polipéptidos son hidrolizados a péptidos de menor peso molecular y aminoácidos por la acción de las enzimas proteolíticas de los microorganismos presentes en el queso (Crow y col., 1995). La enzima más activa del cuajo, o **quimosina**, ejerce un papel

importante en la proteólisis inicial de la mayoría de las variedades de queso. Hidroliza específicamente enlaces peptídicos en los que el grupo carboxílico pertenece a un aminoácido hidrófobo (Fox, 1989) y es responsable de la presencia de nitrógeno soluble en agua de los quesos. También ejerce una actividad importante una proteasa alcalina que contiene la leche, la **plasmína**, presente en la cuajada asociada a las micelas de caseína, es la responsable de la ruptura inicial de las caseínas, sobre todo en quesos cuya cuajada se calienta, inactivándose el cuajo (Matheson, 1981). En casi todos los tipos de queso se acumulan importantes cantidades de γ -caseínas, indicativo de la acción de la plasmína, siendo esta enzima particularmente activa en aquellas variedades de queso cuyo pH aumenta marcadamente a lo largo de la maduración (Trieu-Cuot y Gripon, 1982).

1.4.3. Caracterización de la fracción peptídica de quesos

Las múltiples funciones de los péptidos en los alimentos (antioxidantes, antimicrobianos, tensioactivos...) y su papel en el desarrollo de las características del gusto, así como la información que puede aportar sobre factores como su *genuinidad*, determinan el interés del estudio de estos compuestos en alimentos. Los péptidos pueden servir como indicador de posible deterioro de la leche durante el almacenamiento (López-Fandiño y col., 1993b) y su calidad microbiológica (Mottar y col., 1985), así como para detectar la adición de suero de quesería a la leche (Recio y col., 1996).

La RP-HPLC se ha empleado habitualmente para el análisis de péptidos por su gran versatilidad, tiempos cortos de análisis y elevada resolución (Polo y col, 1992). Sin embargo, durante los últimos años, han aparecido numerosas aplicaciones de la CE para el análisis de biopolímeros (Monnig y Kennedy, 1994; Claire, St., 1996). Se ha comprobado que la CE es una técnica válida para la separación de proteínas lácteas (Cifuentes, 1993 y 1994; Recio y col., 1995) y péptidos (Colburn, 1992) debido a su elevada eficacia y poder de resolución, el pequeño volumen de muestra que requiere, la pequeña cantidad

de tampón necesaria (reduciendo por tanto la cantidad de solventes para eliminar) y la rapidez de sus separaciones (Recio y col., 1997). Por otro lado la CE y la RP-HPLC proporcionan información sobre la pureza de estos biopolímeros y la identidad y cambios estructurales de los péptidos y de las proteínas que pueden constituir. Estas dos técnicas, por sus diferentes mecanismos de separación pueden resolver muchos problemas relacionados con el análisis de estos biopolímeros. Sin embargo, y a pesar de ser una técnica muy prometedora hasta el momento existen pocas aplicaciones de la CE al análisis de los péptidos de queso (Kristiansen y col., 1996; Strickland y col., 1996).

El perfil peptídico de los quesos indica su estado de maduración (González de Llano y col., 1991) e influye decisivamente en su sabor. En la formación del sabor del queso existen aún muchos aspectos desconocidos (Visser, 1993). El sabor es el resultado de un complejo sistema de compuestos. Como se ha comentado anteriormente, la modificación de lípidos y carbohidratos influye en el aroma y el gusto del queso, pero es la modificación de las proteínas lácteas o proteólisis, la que juega el papel predominante, ya que durante la proteólisis se forman compuestos susceptibles de sufrir reacciones químicas y enzimáticas que darían lugar a sustancias aromáticas volátiles y no volátiles. Los principales compuestos aromáticos se encuentran en la fase volátil, pero se considera que la fracción soluble en agua del queso contribuye de forma importante en el aroma y sabor del mismo, debido a los péptidos de bajo peso molecular, los aminoácidos, los ácidos grasos libres y sus productos de degradación (Engels y Visser, 1994). Aunque el papel que juegan los péptidos no está del todo claro, las diferencias en los perfiles peptídicos pueden estar relacionadas con las diferencias de aroma y sabor de los distintos quesos y generalmente se acepta que ciertos péptidos son directamente responsables del desarrollo del sabor amargo en el queso (Habibi-Hajai y Lee, 1996). Jarret y col. (1982) pusieron de manifiesto la relación entre el contenido de nitrógeno amínico y la intensidad del sabor del queso, aunque hasta ahora no se haya demostrado la existencia

de una relación directa. Por otra parte, algunos autores han señalado la importancia del ácido glutámico y los glutamil-péptidos en el sabor del queso (Fritsch, 1992). Estos péptidos presentan un sabor complejo y característico que Ohyama y col. (1988) denominaron "umami".

La caracterización de productos nitrogenados que existen en la fracción del queso soluble en agua se ha utilizado como índice de maduración y se han desarrollado numerosos métodos de extracción y caracterización de los mismos. Los métodos cromatográficos en los que la elución se realiza con agua, facilitan el análisis sensorial de las fracciones recogidas y permiten estudiar la composición química de estas fracciones para relacionarla con las características de aroma y sabor (Salles y col., 1995). Por otro lado, los quesos de oveja y cabra tienen aroma y sabor peculiares, y no han sido tan estudiados como los quesos de vaca, sin embargo los diferentes perfiles peptídicos podrían ser utilizados para la caracterización de quesos elaborados con leche de distintas especies.

1.5. DETERMINACIÓN DEL ORIGEN DE LA LECHE EMPLEADA EN LA ELABORACIÓN DEL QUESO

La posibilidad de determinar los porcentajes de leche que intervienen en la composición de los quesos, es de gran interés científico y de enorme repercusión comercial y económica, tanto para la Administración, con el fin de garantizar el cumplimiento de la legislación, como para la industria, para evitar adulteraciones antes y durante del proceso de fabricación del queso. Se han propuesto numerosos métodos para estas determinaciones en quesos de mezcla que han sido revisados por Ramos y Juárez (1984 y 1986), Addeo y col. (1986), Amigo y col. (1989), Juárez y Rodríguez (1990) y Strange y col. (1992). A pesar que han sido muchos los trabajos dirigidos a estudiar métodos de análisis para detectar la adulteración de la leche y quesos (con diferentes grados de maduración) de oveja y cabra con leche de vaca, en la actualidad se

sigue investigando en esa línea con el objetivo de poder determinar los porcentajes de leche de las tres especies en quesos de mezcla y detectar proteínas de suero desnaturalizadas en quesos de oveja y cabra. La incorporación de concentrados de proteínas de suero desnaturalizadas en la leche antes de cuajar, da lugar a aumentos de rendimiento hasta de un 7% (Banks y Muir, 1985).

1.5.1. Técnicas electroforéticas

Un gran número de estudios se basan en análisis electroforéticos de las proteínas, de suero o caseínas. Las técnicas electroforéticas son adecuadas para el estudio de la detección de mezclas de leche y no requieren reactivos especiales, aunque sí, equipos sofisticados.

Entre los métodos electroforéticos aplicados a la fracción sérica, Amigo y col. (1986), detectan por electroforesis en gel de poliacrilamida, entre el 1-2% de leche de vaca en quesos de oveja con distintos tiempos de maduración; siendo menor el límite de detección si se utiliza tinción de plata (Amigo y col., 1991). Este procedimiento es válido, incluso cuando se emplea como agente coagulante el cuajo vegetal, altamente proteolítico, conclusión obtenida por los mismos autores al estudiar el efecto de distintos parámetros tecnológicos sobre la detección de leche de vaca. Las proteínas de suero tienen la ventaja de no degradarse durante la maduración del queso, aunque tienen el inconveniente de que pueden verse afectadas por el tratamiento térmico. Calvo y col. (1989), han determinado que temperaturas de 90 °C durante 30 segundos, no afectan a la determinación de leche de vaca en leche de oveja o cabra por este método.

Los métodos electroforéticos desarrollados por Amigo y col. (1986, 1989, 1991, 1992), y que han dado lugar a los Métodos Oficiales de Análisis de Leche y Productos Lácteos, en España, para la determinación de leche de vaca en queso de oveja o de cabra y para la determinación de leche de cabra en queso

de oveja, (BOE 30/X/91), se han aplicado, (Molina y col. 1995), en combinación con técnicas estadísticas, como regresión lineal múltiple por pasos sucesivos y regresión en componentes principales, para la predicción de porcentajes de leche de vaca, oveja y cabra en “Queso Ibérico”, cuya principal característica es la mezcla de leche de oveja, vaca y cabra con proporciones entre el 25 y el 40% de cada especie (según la Propuesta de Reforma de la Norma de Composición de Queso Ibérico). La aplicación de técnicas estadísticas a los resultados obtenidos por electroforesis, siendo necesaria la presencia de quesos patrón en la placa, permitió la detección de los porcentajes de leche de todos los quesos patrón con un error inferior al 4%.

El isoelectroenfoque es otra técnica electroforética, que separa en función de los puntos isoeléctricos, muy empleada para este tipo de análisis. Amigo y col. (1992), y Molina y col. (1995), no han encontrado diferencias significativas en los resultados cuantitativos obtenidos por electroforesis y por isoelectroenfoque de las seroproteínas.

En cuanto a los métodos electroforéticos aplicados a la fracción caseínica, Addeo y col. (1984 y 1986), detectan 20% y 10% de leche de cabra y vaca respectivamente en queso de oveja, por isoelectroenfoque de las para- κ -caseínas. Rispoli y col. (1991), determinan cuantitativamente leche de vaca en quesos muy proteolizados como el Roquefort, y Moio y col. (1990), proponen el uso de esta técnica en PhastSystem® como método rápido de detección de leche de vaca en leche o quesos de oveja, cabra y búfala, basándose en el punto isoeléctrico de las γ -caseínas. Existe un método oficial de referencia (DOCE, 29-3-92) para la detección de caseína bovina en quesos, en cantidades inferiores al 1%, basado también en el diferente punto isoeléctrico de las γ_2 y γ_3 -caseínas de vaca respecto a las γ_2 y γ_3 -caseínas de oveja y cabra (estas últimas, de igual punto isoeléctrico) después de la actuación de la plasmina sobre las caseínas. Addeo y col. (1995), han propuesto una modificación del método oficial, utilizando inmunoblotting con anti- β -caseína para detectar γ_2 y γ_3

-caseínas en quesos fabricados con leche de oveja y búfala. No obstante estos métodos no son válidos para detectar proteínas de suero incorporadas a los quesos para aumentar su rendimiento y su valor nutricional. Las proteínas de suero pueden ser añadidas en su forma nativa por preconcentración de la leche del queso por ultrafiltración o se pueden añadir desnaturalizadas. Banks (1990) describe dos formas de incorporación de las proteínas de suero desnaturalizadas en el queso: una cuando la leche del queso ha sido previamente calentada, y otra por adición a la leche que se emplea en la fabricación del queso, del concentrado producido después de calentamiento, acidificación y concentración de las proteínas de suero, obtenido como un sub-producto en la industria quesera.

En los últimos 10 años la electroforesis capilar ha demostrado ser una técnica rápida y eficaz para el análisis de biopolímeros. Sin embargo, aún hay pocas aplicaciones a la separación de proteínas y polipéptidos lácteos. Los capilares de sílice fundida son los que más se han usado, pero presentan un problema importante que es la adsorción de las proteínas sobre la pared capilar. Se han propuesto algunas soluciones para evitarlo. Cifuentes y col. (1993), han demostrado que el uso de capilares recubiertos conjuntamente con aditivos poliméricos en el buffer de separación, proporcionan separaciones rápidas y muy reproducibles. Jong y col. (1993), utilizan un capilar recubierto con un material hidrofílico, y consiguen buenas separaciones de caseínas y proteínas de suero. Cattaneo y col. (1996) detectan y cuantifican un 8% de leche de vaca añadida a leche de oveja o de cabra, basándose en los diferentes tiempos de migración de las α_{s1} -caseínas de las diferentes especies, apuntando la posibilidad de realizar determinaciones cualitativas y cuantitativas en mezclas de leche, basándose en estos estudios preliminares.

Recio y Olieman (1996), han desarrollado un método con capilares recubiertos para la determinación de proteínas de suero desnaturalizadas en la fracción caseínica de leche tratada térmicamente.

1.5.2. Técnicas cromatográficas

Dentro de la cromatografía de líquidos, las primeras técnicas cromatográficas empleadas en el análisis de productos lácteos se realizaron en columnas abiertas, sin embargo los avances en la tecnología de las fases estacionarias y equipos de cromatografía, han provocado que la cromatografía de líquidos de alta eficacia haya sustituido a los métodos clásicos, obteniéndose con ello, análisis más rápidos, sensibles y de gran resolución.

González de Llano y col. (1990) realizan una extensa revisión que describe los análisis de un gran número de productos lácteos por cromatografía de líquidos de alta eficacia y por cromatografía líquida rápida de proteínas.

En nuestro grupo de trabajo, se han desarrollado métodos cromatográficos en fase inversa, usados hasta el momento para separar proteínas de suero bovino, para la detección de mezclas de leche de distintas especies (Frutos y col., 1991 y 1992). La identificación y cuantificación de las β -lactoglobulinas permitió detectar adiciones del 10% de leche de vaca en quesos de oveja, en un tiempo inferior a 6 minutos. Urbanke y col. (1992), detectan hasta un 2% de leche de vaca añadida a leche de oveja y cabra en quesos Peccorino con 2 años de maduración, mediante la cuantificación de β -lactoglobulina A bovina por cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa. Con la misma técnica, Pellegrino y col. (1991, 1992), detectan entre 1 y 3% de leche de vaca en quesos de oveja, en este caso a través de la relación β -lactoglobulina bovina/ α -lactoalbúmina ovina. También se ha desarrollado un método rápido de cromatografía de perfusión (Torre y col., 1996), que puede ser de gran interés para el análisis de rutina, pues realiza las separaciones de proteínas de suero en menos de 2 minutos, pudiendo detectar 10% de leche de vaca en leche de oveja y 10% de leche de oveja en leche de cabra.

López-Fandiño y col. (1993a), han realizado un estudio comparativo por cromatografía de líquidos de alta eficacia, del caseinomacropéptido de oveja,

vaca y cabra. Las diferencias encontradas en cuanto a su comportamiento cromatográfico, hacen pensar en su posible aplicación para la diferenciación de mezclas de leche de distintas especies.

También se ha realizado análisis de seroproteínas, mediante cromatografía rápida de proteínas en una columna de intercambio aniónico, para detectar mezclas de leche de distintas especies, basándose en los distintos tiempos de elución de la α -lactoalbúmina ovina y la β -lactoglobulina bovina (Laezza y col., 1991).

1.5.3. Técnicas inmunológicas

Los métodos de inmunoensayo han sido muy empleados para el análisis de proteínas dada la gran especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo y el carácter antigénico de estos biopolímeros. En estos métodos, para poner de manifiesto si en una muestra existe o no una sustancia dada, el antígeno, se hace reaccionar una alícuota de la muestra con un anticuerpo específico, midiéndose a continuación alguna propiedad característica que sólo tenga lugar si se produce la unión antígeno-anticuerpo. De modo análogo, estos métodos pueden emplearse para detectar anticuerpos en una muestra.

El método de detección empleado varía de unos inmunoensayos a otros, encontrándose los enzimáticos entre los más empleados, lo que es fácil de entender dado el gran aumento en la sensibilidad de detección que las reacciones enzimáticas son capaces de aportar.

Los métodos inmunológicos tradicionales se han aplicado más a las proteínas de suero, que a las caseínas, puesto que su conformación globular les confiere una alta antigenicidad. El análisis de las caseínas por técnicas inmunológicas, aunque posible, es más difícil porque son peores antígenos y aparecen como agregados. La especificidad y alta afinidad de las interacciones antígeno-anticuerpo pueden ser las bases de técnicas analíticas específicas y sensibles,

muy adecuadas para el análisis de alimentos. La sensibilidad a menudo permite dilución de la muestra, minimizando las interferencias de la matriz.

El inmunoensayo más usado, para la determinación de porcentajes de mezcla de leche en quesos, descrito por Levieux (1978), es la inmunodifusión radial, empleado por numerosos autores (Amigo y col., 1989; Barbosa y col., 1989; Cattaneo y col., 1989; Amigo y col., 1991), pero que presenta bastantes limitaciones. Otros métodos aplicados a la detección de mezclas han sido la inmunodifusión cruzada (Elbertzhogen, 1987), detectando entre 0.1-0.2% de leche de vaca en queso de oveja, a través de la caseína bovina y el inmunodotting, empleando antisueros anti-caseína bovina (Aranda, 1993) y antisueros anti-inmunoglobulinas (Calvo y col., 1989). Sin embargo los métodos ELISA (ensayo en inmunoabsorbentes con enzimas ligadas) han sido los métodos más utilizados en el análisis de alimentos, así, García y col. (1990) han empleado ELISA indirecto con antisueros anti-proteínas de suero bovinas, y los mismos autores (García y col., 1991) han desarrollado un ELISA en sandwich que permitió la detección y cuantificación de 1-30% de leche cruda de vaca en leche de oveja. En la misma línea, Rodríguez y col. (1990) han aplicado un procedimiento de ELISA indirecto para la detección de 1-50% de leche de vaca en leche y quesos de oveja, desarrollando antisueros anti-caseínas y que también les permitieron detectar entre 1-25% de leche de vaca en leche y quesos de cabra (Rodríguez y col., 1991). Levieux y Venien (1994), han desarrollado un ELISA en sandwich, empleando dos anticuerpos monoclonales anti- β -lactoglobulina bovina, para la detección de 1 parte de leche de vaca en 100 000 partes de leche de oveja o de leche de cabra.

Los inmunoensayos son capaces de proporcionar gran selectividad dada la naturaleza específica de la unión antígeno-anticuerpo, y en el caso de los métodos inmunoenzimáticos, cuentan además con la alta sensibilidad que proporciona la reacción enzimática. Sin embargo, en la práctica hay una serie de factores que disminuyen esta selectividad. En primer lugar, existen interacciones

no bioespecíficas, de modo que existen adsorciones de sustancias que no son antigénicas. Además, otro factor que influye sobre la selectividad es el hecho de que el anticuerpo no reconoce toda la molécula de antígeno, sino sólo la fracción de él a la que se une, es decir el epitopo. De este modo, moléculas de naturaleza distinta, con epitopos comunes serán reconocidas como iguales por el anticuerpo. A su vez, son métodos laboriosos y de largos tiempos de incubación y lavado, prolongando la duración del análisis. Otro problema que presentan los inmunoensayos, que limita su explotación inmediata, es la disponibilidad del antisuero o anticuerpo apropiado, que en muchas ocasiones tiene que ser desarrollado especialmente para cada caso.

Por otro lado, las técnicas electroforéticas y cromatográficas en algunas ocasiones también son insuficientes, aun considerando la elevada selectividad que estos dos tipos de técnicas son capaces de proporcionar por sí mismas. Hay casos en que la matriz en la que se encuentra la sustancia a determinar es tan compleja que es muy difícil encontrar unas condiciones electroforéticas o de cromatografía de líquidos de alta eficacia, capaces de separar completamente el compuesto de interés. Otra limitación de estas técnicas está relacionada con la sensibilidad, ya que los procedimientos de detección normalmente, empleados no son en ocasiones suficientemente sensibles.

Por ello las técnicas de separación electroforéticas y cromatográficas combinadas con métodos de inmunoensayo para el análisis de proteínas de suero lácteo se presenta como una solución, pues el empleo conjunto de métodos de análisis supone la posibilidad de potenciar las prestaciones de cada uno de los métodos individuales. Entre ellos se pueden destacar dos tipos:

- Procedimientos de **inmunorreconocimiento en sistemas de flujo**. En cromatografía de inmunoafinidad el anticuerpo está retenido en el relleno de una columna cromatográfica, a través de la cual se eluye la muestra que contiene el antígeno o antígenos, quedando éstos retenidos, y separándose del resto de los

componentes que eluyen no retenidos. Además de la versatilidad en el volumen de muestra y del aumento de rapidez, estos sistemas dinámicos simplifican enormemente las etapas de lavado que se realizan en flujo continuo, y las de incubación, haciendo sencilla la automatización, aumentando la reproducibilidad y sensibilidad respecto a los inmunoensayos clásicos y permitiendo la cuantificación. Entre los distintos métodos empleados se puede mencionar la realización de un ELISA en una columna de cromatografía de líquidos de alta eficacia (Frutos y Regnier, 1993).

- Procedimientos de **Western blotting**, en los que en primer lugar se realiza una etapa de separación electroforética y a continuación se lleva a cabo el reconocimiento de las bandas separadas, empleando un anticuerpo marcado. Con la etapa de inmunorreconocimiento se aumentan la sensibilidad, debido al empleo de una reacción enzimática, y la selectividad del análisis, ya que al estar basadas las separaciones en distinto tipo de interacciones que el reconocimiento antígeno-anticuerpo, el empleo conjunto potencia las posibilidades de discriminación.

1.5.4. Técnicas estadísticas

Desde un punto de vista estadístico, las técnicas de regresión (regresión lineal múltiple, regresión en componentes principales y regresión por mínimos cuadrados parciales) y el análisis de correlación canónica pueden ser utilizadas para el estudio de dependencia entre dos conjuntos de variables (grupos X e Y), analizadas en las mismas muestras. Estas técnicas estadísticas han sido muy utilizadas para relacionar la composición química y/o física con propiedades sensoriales (MacFie y Hedderley, 1993; Piggot y col., 1993), en modelos de calibración (Lindberg y col., 1985; Martens y Naes, 1993), y para determinar el porcentaje de componentes en mezclas (Capilla y col., 1988; García-Jares y Medina, 1993).

Las técnicas de regresión son las más adecuadas cuando el objetivo es predecir los valores de la variable o variables en el grupo Y en función de las variables del grupo X, mediante un modelo matemático. Hay que tener en cuenta que un buen ajuste de los datos para el conjunto de muestras utilizadas para definir el modelo (muestras de calibración), no debe confundirse con una buena capacidad de predicción para muestras no utilizadas para definir el modelo (muestras de validación). La capacidad predictiva de los modelos de regresión puede estimarse mediante técnicas de validación externa, si se dispone de un grupo de muestras para evaluación, o interna si sólo se dispone del grupo de muestras de calibración (Weihs, 1993).

En ausencia de multicolinealidad y de datos anómalos la regresión lineal múltiple proporciona el ajuste óptimo de acuerdo con el criterio de mínimos cuadrados. Bajo ciertas hipótesis sobre los errores, es posible estimar, de manera precisa, tanto los valores de los coeficientes del modelo y sus intervalos de confianza, como los valores predichos y sus correspondientes intervalos. La regresión lineal múltiple por pasos sucesivos puede usarse en caso de multicolinealidad entre las variables del grupo X (variables predictoras) y/o para un número insuficiente de muestras. Con esta técnica sólo un conjunto de variables predictoras será utilizado en el modelo (Draper y Smith, 1981; Weihs, 1993).

También es posible recurrir a la regresión en componentes principales que garantiza la no correlación entre las nuevas variables latentes. La selección del número de componentes se realiza mediante validación cruzada para lograr una mejor capacidad predictora. El mayor inconveniente de esta técnica es que las componentes principales se calculan sin tener en cuenta los valores de la variable respuesta (Andrade y col., 1993; Weihs, 1993; Blanco y col., 1994).

La regresión por mínimos cuadrados parciales también puede utilizarse en caso de multicolinealidad (Geladi y Kowalski, 1986; Martens y Martens, 1986). La diferencia con la regresión en componentes principales, está en que esta nueva

técnica incorpora la información de la variable respuesta para la determinación de las componentes (Sekulit y col., 1993; Martens y Naes, 1993; Blanco y col., 1994). La selección del número de componentes se realiza también mediante validación cruzada para lograr una mejor capacidad predictora (Brereton, 1990; Andrade y col., 1993). En general el número de componentes utilizadas por mínimos cuadrados parciales es menor o igual que el utilizado por componentes principales (de Jong, 1993).

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN CASEÍNICA DE LECHE Y QUESO DE OVEJA, VACA Y CABRA

2.1.1. Muestras de leche

Leches puras de gran mezcla de oveja, vaca y cabra, se desnataron por calentamiento de la muestra a 37 °C durante 30 minutos, centrifugación a 2500 g y 20 °C durante 30 minutos, enfriamiento en hielo durante 30 min, eliminación de la capa de grasa con una espátula y filtración a través de lana de vidrio.

2.1.2. Muestras de queso

Se elaboraron en nuestro laboratorio cuatro quesos, tres de ellos puros de leche de oveja, vaca y cabra y el cuarto de mezcla de estas tres especies. Se partió de 10 L de leche de gran mezcla proporcionada por Queserías Ibéricas, S.A. La leche, a su llegada al laboratorio, fue filtrada a través de paño adecuado a este fin. La pasteurización se realizó a 72 °C, 15 s, en un pasteurizador a escala semipiloto (modelo FT 43 de Armfield Technical Education Co. Ltd.) y los quesos se fabricaron en una quesería a escala semipiloto (modelo FT 20 de Armfield Technical Education Co. Ltd.) (**Figura 2**).

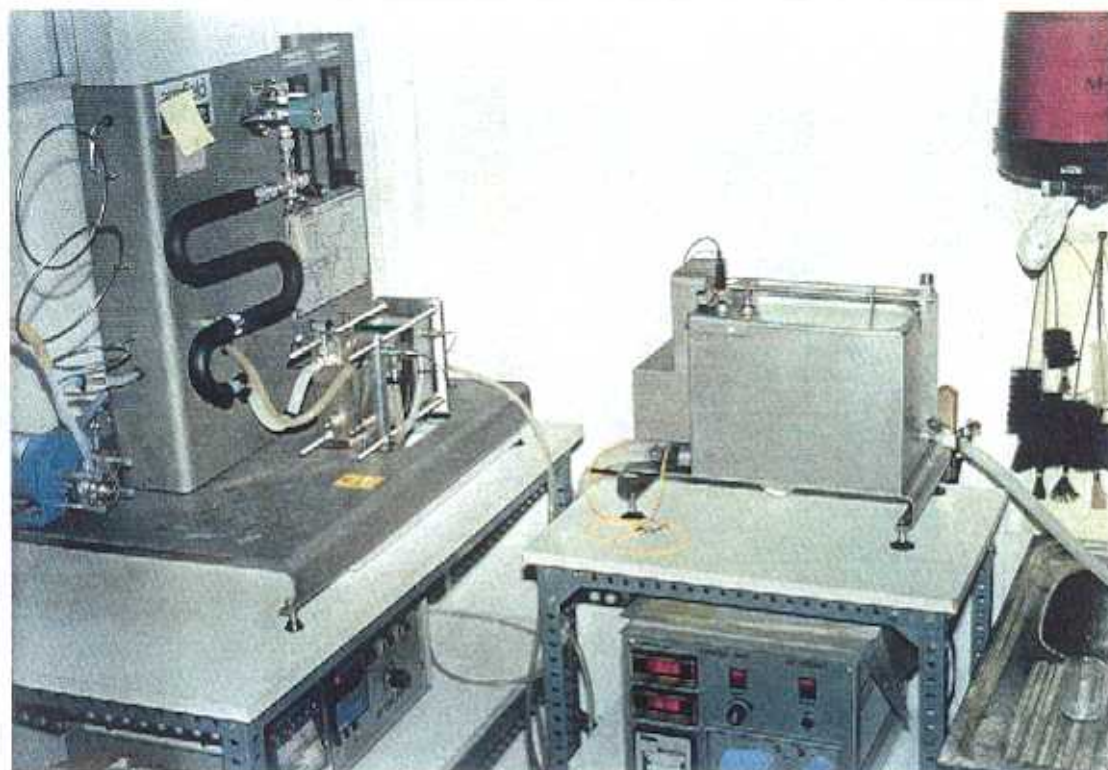


Figura 2: Fotografía del pasteurizador y de la planta de quesería semipiloto empleada para la fabricación de los quesos

Los quesos se elaboraron siguiendo el esquema de la **Figura 3**, como se describe a continuación: la leche fue enfriada a 33 °C y se adicionó el cultivo iniciador (0.05 g/l) (EZAL, mezcla RA021, capacidad 50U; Lacto-Labo), consistente en una mezcla de bacterias lácticas mesófilas, de adición directa a cuba. Después de 35 minutos se adicionó Cl_2Ca (0.025 g/l) y transcurridos otros 5 minutos, el cuajo (0.05 g/l) (Chr. Hansen, fuerza 1:10 000), homogeneizándose durante 5 min y dejándose actuar una hora. El corte de la cuajada se realizó con liras horizontales y verticales de forma que el grano final fuese de tamaño de grano de maíz. El desuerado se llevó a cabo acoplando un filtro a la cuba quesera, donde quedaba retenida la cuajada.

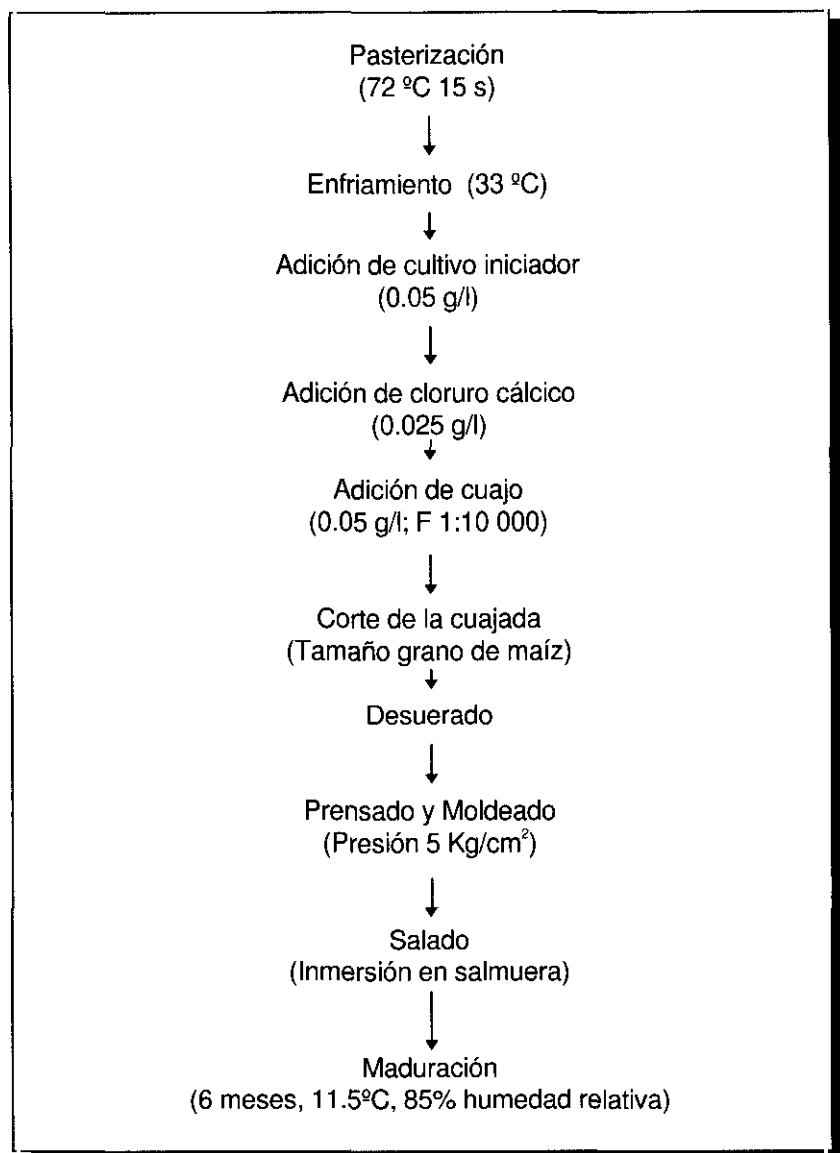


Figura 3: Esquema de la elaboración de queso siguiendo la metodología del Queso Ibérico (BOE, 27-7-87)

Para el moldeado se introdujeron los granos de cuajada en un molde, provisto de paño adecuado, y se sometieron a una presión de 5 Kg/cm², durante dos horas en prensa manual (**Figura 4**), con volteo al finalizar la primera hora. Una vez elaborado el queso se sumergió en una solución de salmuera durante un día, volteándolo igualmente a las doce horas. La maduración continuó durante 6

meses a 11.5 °C de temperatura y 85% de humedad relativa, en una cámara destinada a este fin (Heraeus-Vötsch VTRK 150), mostrada en la **Figura 4**.



Figura 4: Fotografía de la prensa manual utilizada en el moldeado y prensado de los quesos y cámara de maduración empleada

Además de estos quesos elaborados en el laboratorio, se analizaron los siguientes quesos elaborados a escala industrial en distintos países en el marco de un Proyecto Europeo de Investigación (UE Regulation 1116/92-5.4).

- ❑ Queso Feta de 25 días meses de maduración
- ❑ Queso de leche de cabra y oveja de 22 días de maduración.
- ❑ Queso Ibérico de seis meses de maduración

2.1.3. Obtención de las caseínas

Para la obtención de caseínas se siguió el protocolo especificado en el Método Oficial de Referencia para la detección de caseína de vaca en quesos de oveja y cabra (Reglamento UE nº 690/92, DOCE del 20-3-92). Brevemente: 5 g de queso se homogeneizaron con 60 mL de agua, se precipitaron las caseínas a pH 4.6 y el sobrenadante fue desechado. El precipitado se homogeneizó con 40 mL de agua acidulada a pH 4.6 y 20 mL de diclorometanano, centrifugándose a continuación a 3500 *g* durante 5 minutos. La operación se repitió hasta que las dos fases de extracción quedaron incoloras. Posteriormente las caseínas se secaron con acetona seca o se liofilizaron.

❑ Tratamiento con plasmina

Para la hidrólisis de las β -caseínas, 25 mg de caseína anteriormente extraída se suspendieron en 0.5 mL de solución de carbonato amónico 0.2 M, etilendiaminotetraacetato (EDTA) 0.05 M, pH 7.8, y se homogeneizaron durante 20 minutos. A la mezcla calentada a 40 °C, se añadieron 10 μ L de plasmina (EC 3.4.21.7, 5 U/mL), incubando durante 1h a la misma temperatura con agitación constante. Después de inhibir la enzima se liofilizaron.

2.1.4. Técnicas electroforéticas

❑ PAGE-urea a pH alcalino

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) se realizó en placas de 180 x 160 x 0.7 mm, en una cubeta modelo SE 400 de Hoefer. Las fuentes de

alimentación fueron ISCO modelo 490 (0-1500 mA, 0-1000 V) y Hoefer modelo PS 500 XT (500 V, 400 mA y 200 W).

Las caseínas extraídas y liofilizadas se analizaron mediante PAGE siguiendo el método de Ramos y col. (1977), utilizando geles de poliacrilamida con $T = 7.7\%$ y $C = 2.6\%$, conteniendo urea 4.79 M. La electroforesis fue programada a intensidad constante de 10 mA hasta que la muestra penetraba en el gel y 20 mA hasta el final de la carrera, siendo la duración total de la misma aproximadamente de 2h y 30 min. Se inyectaron 10 μL de una solución de muestra compuesta por una parte de una solución de 6% de proteína en urea 7M y 9 partes de azul de bromofenol al 0.05% y glicerol al 40%.

PAGE-SDS en PhastSystem®

Se realizó PAGE de las caseínas en presencia del agente desnaturalizante dodecil sulfato sódico (SDS), utilizando geles comerciales Homogeneous 20% (Pharmacia), con tiras de electrodos de SDS también comerciales (Buffer Strips for SDS, Pharmacia). La electroforesis se llevó a cabo en un equipo automatizado, PhastSystem® (Pharmacia) dotado de una unidad de separación y control y una unidad de tinción. La carrera electroforética se realizó siguiendo la Nota de Aplicación nº 111, del manual del equipo, cuyas condiciones eléctricas se muestran en la **Tabla 5**. El volumen de muestra aplicado en el extremo anódico fue 1 μL .

Tabla 5. Condiciones eléctricas de la PAGE-SDS de caseínas

	TENSIÓN (V)	INTENSIDAD (mA)	POTENCIA (W)	TEMPERATURA (°C)	VOLT. HORA
PRE-ELECTROFORESIS	250	10	3	15	1
APLICACIÓN MUESTRA	250	1	3	15	1
ELECTROFORESIS	250	10	3	15	95

☐ Isoelectroenfoque en geles ultrafinos

La separación mediante IEF se realizó en un equipo LKB compuesto por una cámara de electroforesis horizontal Multiphor 2117, un baño termostático Multitemp II 2219 y una fuente de alimentación Macrodrive 5, 2297 de potencia constante.

Se utilizaron geles ultrafinos de 0.2 mm de espesor y composición T=5% y C=3%, con gradiente de pH de 3-9 con reforzamiento en la zona de pH de 5-7, fabricados en el laboratorio según el Método Oficial de Referencia para la detección de caseína de leche de vaca en queso de oveja (Reglamento UE nº 690/92, DOCE del 20-3-92). La carrera electroforética (cuyas condiciones se muestra en la **Tabla 6**) y la tinción se realizaron según este método.

Las muestras de caseína liofilizada se disolvieron en urea 9 M hasta una concentración del 1.5% y se les añadió 1% de 2-mercaptoetanol. Las caseínas que fueron tratadas con plasmina se disolvieron en un tampón con 48% (p/v) de urea, 11.5% (p/v) de glicerol y 0.5% (p/v) de ditiotreitol. Se aplicaron 15 µL de muestra sobre el extremo anódico del gel.

Tabla 6. Condiciones eléctricas empleadas en IEF de las caseínas en geles ultrafinos.

	TENSIÓN (V)	INTENSIDAD (mA)	POTENCIA (W)	TIEMPO (min)
PREENFOQUE	2500	15	4	30
APLICACIÓN MUESTRA	2500	15	4	60
ENFOQUE FINAL	2500	5	20	60
	2500	6	20	40
	2500	7	25	30

Electroforesis bidimensional: 1ª dimensión PAGE-urea a pH alcalino- 2ª dimensión IEF

La electroforesis bidimensional de las caseínas, PAGE-urea a pH alcalino en la primera dimensión seguida de isoelectroenfoque en segunda dimensión se realizó siguiendo el procedimiento de Di Luccia y col., (1986). La primera separación se realizó tal y como se ha descrito anteriormente en este apartado, excepto que se inyectaron 30 μ L de la solución de muestra en el pocillo. Después de la carrera se separó, mediante corte con bisturí, la calle del gel en que se había realizado la primera separación. Esta tira de gel se sometió a un primer lavado con agua destilada y después se dejó equilibrar durante 15 minutos en una solución de urea 9M conteniendo 1% de 2-mercaptoetanol. A continuación, la tira de gel se depositó en la parte alcalina del gel de isoelectroenfoque y se sometió a la segunda separación, que se realizó en geles finos de 1mm de espesor y composición T = 5%, C = 3%, con gradiente de pH de 2.5-9, siguiendo el método de Addeo y col. (1984).

Métodos de tinción y secado

La tinción de los geles de PAGE en equipo convencional se realizó con Coomassie Blue R-250 siguiendo el método de Winter y col. (1977). El secado se realizó a vacío a 80 °C durante 1h 30 min, en un secador de placas, colocando el gel entre dos hojas de papel de celofán empapadas en agua destilada.

La tinción de los geles de PAGE-SDS en PhastSystem® se realizó con Coomassie Blue R-350 siguiendo la Nota de Aplicación nº 200 del Manual del equipo. El secado se llevó a cabo cubriendo el gel con una hoja de papel de celofán empapada en agua destilada y bajo peso.

La tinción de los geles de isoelectroenfoque se realizó según el Método Oficial de Referencia para la detección de caseína de leche de vaca en queso de oveja (Reglamento UE nº 690/92, DOCE del 20-3-92). El secado se realizó a temperatura ambiente.

☐ **Electroforesis capilar**

Las separaciones por electroforesis capilar se llevaron a cabo en un equipo P/ACE 2050 (Beckman), controlado por el programa System Gold (Beckman). Se siguió el método de Recio y Olieman (1996), utilizando un capilar de sílice con recubrimiento hidrofílico neutro (Supelco CElect P1), de 37 cm de longitud total (L) y 30 cm de longitud efectiva (l), de 75 µm de diámetro interno (I.D.).

El tampón de separación, pH 3, estaba compuesto por 6 mM de urea, 0.05% (p/v) de metilhidroxietilcelulosa (MHEC), 20 mM de citrato trisódico dihidratado y 0.32 M de ácido cítrico. Las muestras de caseínas liofilizadas, 25 mg, se disolvieron en 1 mL de tampón de la muestra diluido con agua (1.5:1). El tampón de la muestra, de pH 8.6, estaba compuesto por 10 M de urea, 0.083% (p/v) de MHEC, 167mM de Tris(hidroximetil)aminometano (Tris), 67 mM de etilendiaminotetraacetato sódico (EDTA), y 17 mM de DL-ditiotreitol. Las muestras se incubaron en el tampón durante una hora a temperatura ambiente. La urea 10 M, con 0.083% de MHEC, se trató previamente con 2.5% (p/v) de resina desionizante, agitando hasta que su conductividad fue inferior a 2 µS/cm y se filtró a través de papel Whatman nº 41. Los tampones y muestras se filtraron a través de filtros Acrodisc® de 0.22 µm (Gelman Science). Las muestras se inyectaron durante 15 segundos a una presión de nitrógeno de 0.5 psi.

Se utilizaron sistemas modelo de caseínas de leche y queso tratadas con plasmina para la identificación de los productos de degradación de las caseínas.

2.2. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN SEROPROTEICA DE LECHE Y QUESO DE OVEJA, VACA Y CABRA

2.2.1. Muestras de leche

Para realizar el estudio de la cuantificación de β-lactoglobulina de leche de vaca se analizaron 12 leches individuales de vaca de cada una de las siguientes razas: Fleckvieh, Holstein y Menorquina.

2.2.2. Muestras de queso

Se elaboraron 10 quesos patrón, a escala de laboratorio, con leche de oveja, vaca y cabra, con diferentes porcentajes de leche pasteurizada y desnatada de cada especie, siguiendo la metodología descrita en el Método Oficial de Referencia para la detección de caseína de leche de vaca en quesos de leche de oveja (DOCE, 19-3-92), que consiste en una acidificación de la leche a pH 4.6 con ácido láctico (10% p/v) y posterior coagulación a 35 °C con cuajo animal (Chr. Hansen, de fuerza 1:10000; 0.025 g/ml), dejándose reposar durante 1 hora, cubierto con papel de aluminio. La cuajada resultante se congeló y liofilizó.

Los porcentajes de leche de vaca, oveja y cabra seleccionados para la elaboración de los 10 quesos empleados en el estudio, se representa en el diagrama ternario de la **Figura 5**, donde todos los puntos experimentales están igualmente espaciados en todo el recinto experimental.

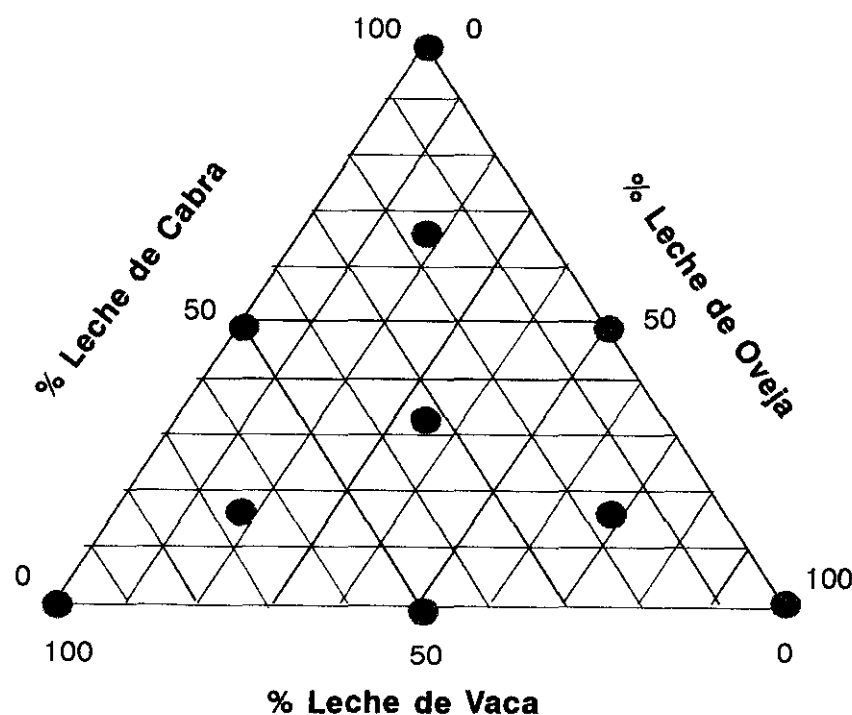


Figura 5: Diagrama ternario de los puntos experimentales correspondientes a los porcentajes de leche de oveja, vaca y cabra utilizados en la elaboración de los quesos patrón.

Con la información aportada por los 10 quesos patrón se realizó la predicción del porcentaje de leche de oveja, vaca y cabra en un queso fabricado con leche ultrafiltrada de mezcla de las tres especies, cedido por el Dr. Jesús Rodríguez del Instituto del Frío del CSIC.

2.2.3. Obtención de las proteínas de suero

La fracción de las proteínas de suero se extrajo añadiendo a las muestras de leche tampón acetato (0.1M)-ácido acético (10%) o HCl 1M, hasta pH 4.6. Las caseínas precipitadas se separaron por centrifugación a 4500 *g*, durante 15 minutos, a 5 °C y el sobrenadante que contenía las seroproteínas se filtró a través de papel Whatman nº 1.

2.2.4. Técnicas electroforéticas

Isoelectroenfoque en PhastSystem®

El isoelectroenfoque se realizó en equipo automatizado, PhastSystem®. Se utilizaron geles comerciales (PhastGel IEF 3-9). Se aplicó automáticamente 1 µL de muestra en el extremo anódico del gel. Se siguieron las condiciones electroforéticas especificadas en el manual del equipo en la Nota de aplicación, nº 100 (Tabla 7).

Tabla 7. Condiciones eléctricas del IEF de proteínas de suero en Phastsystem®

	TENSIÓN (V)	INTENSIDAD (mA)	POTENCIA (W)	TEMPERA- TURA (°C)	VOLT. HORA
PRE-ENFOQUE	2000	2.5	3.5	15	75
APLICACIÓN MUESTRA	200	2.5	3.5	15	15
ENFOQUE FINAL	2000	2.5	3.5	15	410

☐ Métodos de tinción, secado y análisis de imagen

El secado se realizó a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente, las placas de isoelectroenfoque en PhastSystem® fueron analizadas e integradas en un analizador de imagen, Bioimage Analyzer 3CX (Millipore), siguiendo el programa "Whole Band Analysis" que estima la intensidad integrada de las bandas electrofóreticas (I.I.) y los porcentajes de las intensidades integradas (%I.I.).

☐ Electroforesis capilar

La separación mediante electroforesis capilar de las proteínas de suero se realizó en un capilar de sílice fundida (Polymicro Technologies), de 37 cm de longitud total, 30 cm de longitud efectiva y de 75 μm de diámetro interno. El equipo utilizado fue el mismo que el descrito en el apartado 2.1.4. de Materiales y Métodos. El tampón de separación seleccionado fue 100 mM borato pH 8.2 + 30 mM Na_2SO_4 . Las separaciones se llevaron a cabo a 7 kV y 25°C. La inyección se realizó en el ánodo con presión de nitrógeno (0.5 psi) durante 2 s. La detección se llevó a cabo en la columna capilar a 214 nm. Los tiempos de migración fueron calculados relativamente a un patrón interno (P.I.), el péptido lisina-triptófano-lisina. Se añadieron 10 μl de patrón interno (8 mg/ml) a 400 μl de muestra.

Como patrones se utilizaron α -LA, β -LG A, β -LG B, inmunoglobulina G (Ig G), y lactoferrina (LF) bovinas (Sigma). Las proteínas patrón y las muestras se pasaron a través de filtros Acrodisc® de 0.22 μm (Gelman Sciences). Los tampones se pasaron a través de filtros de nylon-66 Pro-X® de 0.22 μm (Teknokroma).

2.2.5. Técnicas estadísticas

Para la predicción de los porcentajes de leche de las tres especies en función de las intensidades integradas, los porcentajes de intensidades integradas y las

áreas de las bandas electroforéticas obtenidas, se utilizaron las siguientes técnicas de regresión: regresión lineal simple (RLS), regresión lineal múltiple por pasos sucesivos (SMLR), regresión en componentes principales (PCR) y regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).

Estas técnicas de regresión han sido aplicadas para la determinación de los porcentajes de leche que intervienen en la composición de los quesos.

La capacidad predictiva de los modelos de regresión se ha estimado con la suma de cuadrados de los residuos mediante validación cruzada ($PRESS_{cv}$) que puede calcularse mediante la siguiente ecuación:

$$PRESS_{cv} = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_{(i)})^2$$

donde y_i representa el i-ésimo valor de la variable respuesta en el grupo Y, $\hat{y}_{(i)}$ es el valor predicho por el modelo obtenido sin la muestra i-ésima, y n es el número de muestras. Este método de validación cruzada es conocido como "leave-one-out cross validation" (Sekulit y col., 1993; Martens y Naes, 1993).

Una aproximación del error de predicción del modelo se ha obtiene mediante:

$$RMSEP_{cv} = \sqrt{PRESS_{cv} / n}$$

Para la realización de los correspondientes cálculos se utilizaron, el paquete estadístico BMDP (Dixon, 1988), el programa UNSCRAMBLER 6.1 (Camo AS, 1996), el programa SYSTAT 6.01 (SPSS Inc., 1996) y un programa propio escrito en lenguaje BASIC. Todos estos programas fueron ejecutados en un ordenador personal PC-486DX.

2.3. FRACCIONAMIENTO Y ANÁLISIS DE PÉPTIDOS EN QUESOS DE OVEJA, VACA Y CABRA

2.3.1. Muestras de quesos

Se utilizaron los mismos quesos fabricados en el laboratorio descritos en el apartado 2.1.2., con seis meses de maduración, además de un queso comercial Manchego con denominación de origen, de nueve meses de maduración.

2.3.2. Obtención y análisis de la fracción peptídica de $P_m < 10\ 000\ D$

Para obtener la fracción de nitrógeno soluble en agua (WSNF) de los quesos de oveja, de vaca y de cabra, se siguió el procedimiento descrito en el esquema en la **Figura 6** y que se describe a continuación: 10 g de queso fueron homogeneizados con 50 mL de agua en un Ultra-Turrax (5 min, 40 °C). Los homogeneizados se mantuvieron durante 1 hora a 40 °C y se filtraron a través de lana de vidrio. Posteriormente, de estos WSNF, se obtuvieron dos fracciones de diferente peso molecular en tubos Centriprep (Amicon, Beverly, MA, USA) con membranas de tamaño de corte de 10 000 D de peso molecular, centrifugando a 3000 *g* durante 45 min a 25°C. La fracción de peso molecular inferior a 10 000 D (WSNF<10 000) fue fraccionada en cartuchos Sep-Pak C18 (Millipore) recogiendo 6 fracciones diferentes. Los cartuchos Sep-Pak C18 se acondicionaron como describen Herraiz y Casal (1995). Se cargó 1 ml de WSNF<10 000 D en el cartucho. Se recogieron: la fracción no retenida, la fracción eluida con 1 ml de agua con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) y otras cuatro fracciones más, eluidas con alícuotas de 1 ml de 10, 20, 30 y 100% de acetonitrilo (AcN) con 0.1% de TFA en agua con 0.1% TFA.

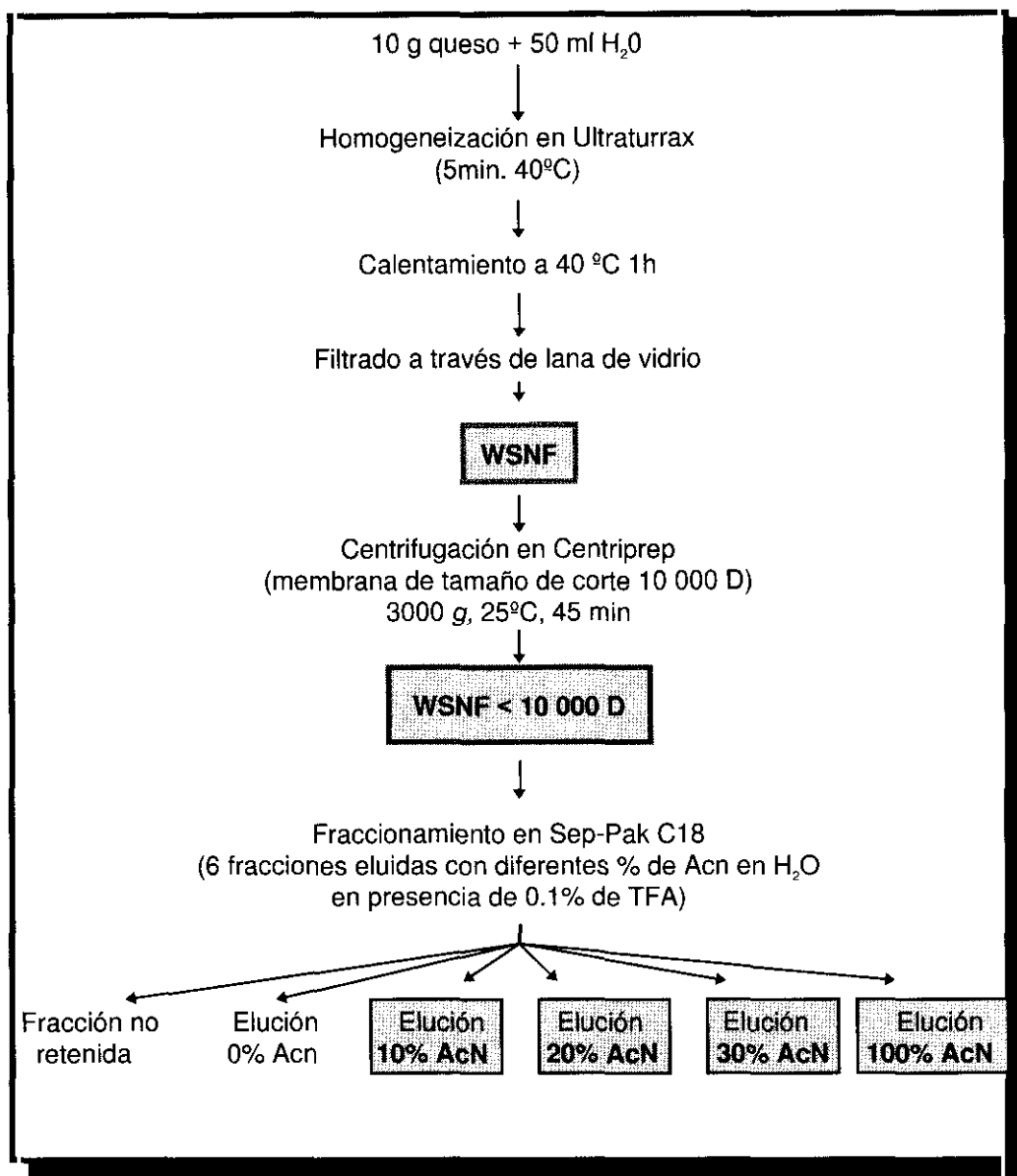


Figura 6: Esquema de obtención y fraccionamiento del nitrógeno soluble en agua de peso molecular inferior a 10 000 D (WSNF < 10 000D).

❏ **Análisis de péptidos por cromatografía de líquidos**

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos con 2 bombas M116 (Beckman) y un inyector automático 717 plus de Waters con una espira de carga de 50 µL. La detección se realizó en un detector de fotodiodos alineados M168 (Beckman). El control del equipo y la adquisición de datos se realizó utilizando el programa

System Gold versión 7.11 (Beckman). Las separaciones se llevaron a cabo en una columna C18 Nucleosil 5- μm , 300 Å (4.6 x 250 mm) (Macherey Nagel Düren) a 40°C. El eluyente A fue 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua Milli-Q (Millipore Corp.) y el eluyente B: 0.1% TFA en acetonitrilo, 0.1% TFA en agua (60:40 v/v). Se siguió el método de González de Llano y col. (1991), cuyo gradiente se muestra en la **Tabla 8**. El flujo fue de 1 ml/min y se analizaron las muestras simultáneamente a 214 y a 280 nm. Las muestras fueron filtradas, antes del análisis, a través de filtros Durapore 0.45 μm (Millipore).

Tabla 8. Gradiente empleado en la separación de péptidos por HPLC
(González de LLano y col., 1991).

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0	100	0
10	20	80
90	0	100
110	100	0
130		

Se utilizaron como patrones los aminoácidos aromáticos comerciales tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) y triptófano (Trp) (Sigma Chemicals).

Análisis de péptidos por electroforesis capilar

Se utilizó el mismo equipo descrito en el apartado 2.1.4. Las separaciones se realizaron en un capilar de sílice fundida con recubrimiento hidrofílico neutro Supelco CElect P1, con L= 47 cm, l=40 cm y 50 μm I.D. El tampón de separación seleccionado fue ácido acético 0.3 M, y ácido fórmico 0.3 M, pH 2.5, filtrado previamente a través de filtros Acrodisc® de 0.22 μm (Gelman Sciences). La inyección de la muestra se realizó por presión de nitrógeno (0.5 psi) durante 2 segundos e el extremo anódico. Las separaciones fueron

realizadas a temperatura ambiente y a un voltaje de 20 kV. La detección se realizó a 214 nm y a 280 nm.

Se utilizaron los mismos patrones comerciales de los aminoácidos aromáticos Tyr, Phe y Trp, empleados en HPLC.

2.3.3. Obtención y análisis de fracciones peptídicas de $P_m < 1\ 000\ D$

Para la obtención de la fracción de nitrógeno soluble en agua (WSNF) en un Queso Manchego, se siguió el procedimiento de Salles y col., (1995), descrito esquemáticamente en la **Figura 7**.

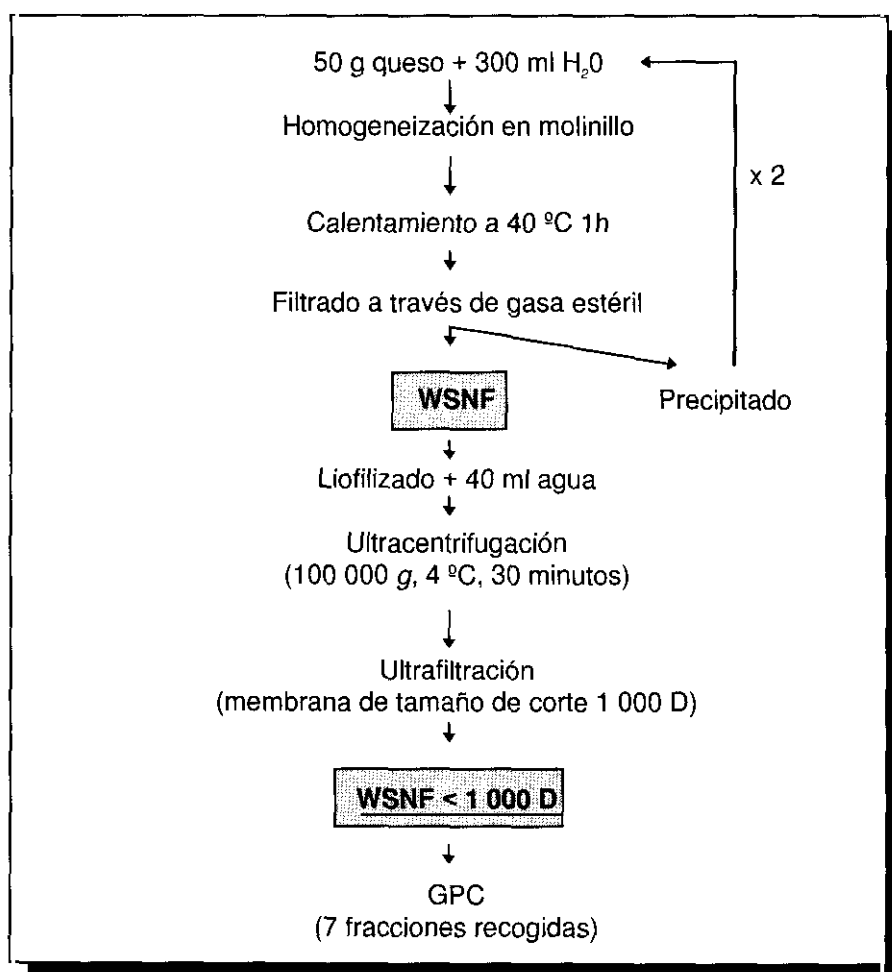


Figura 7: Esquema de obtención y fraccionamiento del nitrógeno soluble en agua de peso molecular inferior a 1 000 D (WSNF < 1 000 D).

Este procedimiento se describe a continuación: 50 g de queso fueron homogeneizados en 300 ml de agua. Los homogeneizados se mantuvieron durante una hora a 40 °C y se filtraron a través una gasa estéril. Esta operación se repitió dos veces más homogeneizando el precipitado cada vez con 300 mL de agua. El filtrado, o WSNF, fue liofilizado y redissuelto en 40 ml de agua. Se realizó una ultracentrifugación a 100 000 *g*, 4 °C, durante 30 minutos. Posteriormente se realizó una ultrafiltración del sobrenadante a 4°C a través de una membrana de celulosa reducida (DIAFLO Filtron Technologie Corporation) con tamaño de corte de 1 000 D (tipo YM1). Esta membrana se dispone en una celda de filtración AMICON (Danvers) de 50 ml de volumen y 43 mm de diámetro. Se aplica una presión de N de 3 bares sobre la superficie del líquido en agitación permanente. El ultrafiltrado se dispuso en alícuotas de 5 y 2 ml y se congeló a -20 °C hasta su análisis.

Las alícuotas de 5 ml del ultrafiltrado de peso molecular inferior a 1 000 D (WSNF<1 000) fueron fraccionadas en una columna Superformance (1.6 x 60 cm) (Merck) de gel permeación, con válvula de inyección manual. La fase estacionaria está constituida por un gel Fractogel® TSK HW 405 (Merck) esférico, hidrófilo y poroso (20-49 µm), copolímero de etilén glicol y de polímeros del tipo metacrilato para fraccionamiento entre 100 y 10 000 D. El copolímero tiene una superficie fuertemente hidrófoba debido a la presencia de otras uniones en el polímero. La elución se realizó a temperatura ambiente con agua Milli-Q. Se mantuvo un flujo constante de 1 ml/min con una bomba IP31 (Duramat) recogiendo 7 fracciones diferentes en un colector de fracciones TDC 80 (Gilson Medical Electronics, Inc.). La absorbancia de cada fracción se midió a 214 nm con un espectrofotómetro Lambda 15 (Perkin-Elmer Corp). Estas fracciones fueron liofilizadas y cada una de ellas disueltas en 10 ml de agua.

■ **Determinación de iones**

Se realizaron determinaciones de cloruros y fósforo inorgánico con Kits de Sigma Chemicals y de Ca^{2+} , Na^+ y K^+ con un espectrofotómetro de ionización de llama (Eppendorf, Hamburg, Alemania) (Salles y col., 1995).

■ **Análisis de péptidos por cromatografía de líquidos**

Se utilizó el mismo equipo mencionado anteriormente en 2.3.2. Las separaciones se llevaron a cabo utilizando una columna Nova-Pak C18 (Waters), 60Å, 4 µm (3.9 x 150 mm I.D.). Los análisis se realizaron a temperatura ambiente y la detección a 214 y 280 nm. Se utilizó un gradiente binario de 0 a 40% de B en 70 min con los siguientes eluyentes: A) 0.1% de TFA en agua y B) 0.1% de TFA en AcN, con un gradiente. El flujo de fase móvil fue de 1 ml/min.

■ **Análisis de aminoácidos libres por cromatografía de líquidos**

Se realizó en un equipo formado por 2 bombas M-6000A (Waters), inyector automático WISP 710B (Waters), detector de fluorescencia M-420 AC (Waters), (λ de excitación 340 nm y λ de emisión 425 nm) y módulo de interfase SIM (Waters) conectado a un ordenador personal. El control del equipo y la adquisición y procesamiento de los datos se realizó utilizando el programa Maxima 820 de Waters.

Para llevar a cabo las separaciones se utilizó un sistema de columnas formado por una columna mezcladora de bolas de vidrio (400 µm-500 µm de diámetro de partícula), una guarda columna Nova-Pak C18 de 60Å, 4 µm (3.9 x 20 mm) y una columna Nova-Pak C18 (Waters), de 60Å, 4 µm (3.9 x 150 mm). Los eluyentes fueron A: metanol/fosfato sódico 10 mM pH 7.3/tetrahidrofurano (19:80:1) (v:v:v) y B: metanol/fosfato sódico 10 mM pH 7.3 (80:20) (v:v).

El análisis fue realizado mediante una reacción de derivatización precolumna, en la que los aminoácidos primarios reaccionan con ortoftaldialdehído (OPA). La

preparación del reactivo derivatizante se realizó disolviendo 500 mg de OPA en 22.5 ml de metanol y llevándolos a 25 ml con una solución de tampón borato 0.4 M, pH 10. Se añadieron 400 μ l de 2-mercaptoetanol y cada dos días 40 μ l más para reponer las pérdidas producidas por evaporación. Antes de su empleo se pasaron a través de filtros de 0.45 μ m (Durapore, Millipore). En la separación cromatográfica de los aminoácidos con OPA, mediante el programa de gradiente expuesto en la **Tabla 9**, se ha seguido el método descrito por González de Llano y col. (1991).

Tabla 9. Gradiente empleado en la derivatización de los aminoácidos y la separación de los derivados.

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0	0	100	0
2	0.1	100	0
2.5	1.5	100	0
8.5	1.5	85	15
13.5	1.5	85	15
18.5	1.5	70	30
22.5	1.5	60	40
34.5	1.3	20	80
40.5			

Para las reacciones de derivatización precolumna, alícuotas de OPA y de muestra se introdujeron en viales de vidrio dispuestos en el carro del inyector automático. El equipo y el programa permiten tomar la solución del OPA que queda retenida en el bucle del inyector y al minuto, se toma la muestra. Las condiciones iniciales del gradiente con un flujo de 0.1 ml/min permiten que se mezcle el OPA con la muestra y que reaccionen en la columna mezcladora de bolas de vidrio durante 1 min. Se inyectaron 12 μ l de OPA y 10 μ l de muestra

diluida en tampón borato 0.4 M pH 10. Antes de ser inyectadas, las muestras se filtraron a través de filtros 0.45 μm (Durapore, Millipore).

2.4. EMPLEO CONJUNTO DE TÉCNICAS DE SEPARACIÓN Y MÉTODOS INMUNOLÓGICOS PARA ANÁLISIS DE CANTIDADES TRAZA DE PROTEÍNAS DE SUERO NATIVAS Y DESNATURALIZADAS

2.4.1. Muestras de leche

- ☐ Leche pasteurizada de vaca. Se preparó en el laboratorio por calentamiento de leche cruda de vaca a 65°C, 30 minutos.
- ☐ Leche estéril de vaca. Se preparó en el laboratorio por calentamiento de leche cruda de vaca (del mismo lote de leche que en el caso anterior) en autoclave a 120°C, 30 minutos.
- ☐ Leche UHT de vaca. Se adquirió en un establecimiento comercial.

2.4.2. Muestras de queso

Se estudiaron un total de 76 muestras de quesos de leche de oveja, de cabra, de oveja y cabra y de oveja, cabra y búfala, fabricados por 9 elaboradores de queso en diferentes países de la Unión Europea según distintas tecnologías. En cada uno de los ensayos colaborativos que se realizaron durante más de dos años, se analizaron 5-6 muestras ciegas que contenían entre 0 y 5% de leche de vaca, y 2-3 patrones con 0, 1 y 3% de leche de vaca. La leche de vaca había sido sometida a diferentes tratamientos térmicos como se indica más adelante. Estos quesos fueron fabricados en el marco del Proyecto Europeo: "Comparative evaluation of methods for the detection of cows' milk in cheese from ewes', goats' and buffalos' milk" (EEC regulation 1116/92-5.4), en el que intervenían 15 laboratorios de 5 países europeos y se evaluaban hasta 17 métodos diferentes.

Quesos con leche pasteurizada de vaca añadida

Se analizaron 13 muestras de quesos elaborados con leche pasteurizada (67°C, 10 min ó 65°C, 25 min) de oveja, de cabra y de oveja y cabra y 5 muestras de queso tipo Feta con 25 días de maduración, fabricados con leche de oveja y cabra. Todos estos quesos contenían entre 0 y 5% de leche pasteurizada de vaca. Se utilizaron como patrones otras cinco muestras más, con 0, 1 ó 3% de leche pasteurizada de vaca añadida. Los patrones fueron elaborados de los mismos lotes de producción que los quesos anteriores y fueron liofilizados.

Quesos con leche UHT de vaca añadida

Se analizaron 25 muestras de quesos fabricados con leche cruda, pasteurizada (72°C, 30 s) o calentada (subiendo la temperatura durante 25 min de 10 a 70°C y enfriando durante 17 min a 42°C) de oveja, de cabra, de oveja y cabra y de oveja, cabra y búfala a diferentes tiempos de maduración (21 días, 60 días ó 190 días), que contenían entre 0 y 5% de leche UHT de vaca añadida. Se utilizaron como patrones otros 8 quesos con 0 y 1% de leche UHT de vaca añadida.

Quesos con proteína desnaturalizada de leche de vaca añadida

Se analizaron 10 muestras de quesos fabricados con leche cruda o pasteurizada (72°C, 30 s) de oveja y cabra y 5 muestras de quesos tipo Roquefort fabricados con leche de oveja, a diferentes tiempos de maduración (21 días, 60 días, ó 165 días), que contenían entre 0 y 5% de proteína desnaturalizada de suero de vaca. Se utilizaron como patrones cinco quesos adicionales con 0 ó 1% de proteína desnaturalizada de vaca.

Cuajadas con 0 y 1% de leche de vaca añadida

Se analizaron 14 cuajadas fabricadas con leche de oveja y cabra con porcentajes de leche de vaca añadida entre 0 y 1%.

2.4.3 Aislamiento de las proteínas de suero del queso

Las **proteínas de suero nativas** fueron obtenidas por homogeneización de 5 g de queso con 8 mL de agua (ó 12 mL de agua cuando el queso estaba liofilizado), precipitación de las caseínas con 1N HCl, pH 4.6 y centrifugación a 3000 g, 20 min.

Las **proteínas de suero desnaturalizadas** fueron obtenidas de la fracción caseínica (apartado 2.1.3) siguiendo el método descrito por Calvo y col. (1992) que consiste en homogeneizar 10 mg de caseína con 100 µL de tampón Tris-glicina 0.01M, pH 8.3 y 3 µL de β-mercaptoetanol. Después de una incubación de 2h a T^a ambiente (23 °C) se centrifugó a 3000 g, recogiendo la fracción soluble y desechando el precipitado.

2.4.4. Aislamiento de las caseínas del queso

Se realizó como en el apartado 2.1.3. de esta memoria.

2.4.5. Isoelectroenfoque en geles ultrafinos

Se siguió el mismo procedimiento indicado en el apartado 2.1.4. de la memoria.

2.4.6. Inmunocromatografía

Se ha estudiado la posibilidad de emplear como método inmunocromatográfico un ELISA en columna, basándonos en el método de Frutos y col. (1993), modificándolo para la detección de β-lactoglobulina bovina en productos lácteos.

En primer lugar se empleó una columna de β-LG AB para aislar los anticuerpos anti-β-LG bovina a partir del correspondiente antisuero desarrollado en oveja (fabricado por el grupo del Dr. Calvo en la Universidad de Zaragoza), empleando como fase móvil PBS (tampón fosfato salino) pH 7. La columna de afinidad (4.6 mm x 5 cm) se fabricó con Affi-Prep 10 (Bio-Rad), que se une a través de los grupos amino de la proteína.

Una vez seleccionada la fracción óptima de anticuerpo anti- β -LG bovina, desarrollado en oveja purificado, se preparó una columna de anti- β -LG bovina (2.1 mm x 5 cm), utilizando como soporte Affi-Prep Hz (Bio-Rad).

En esta columna se siguió el procedimiento esquematizado en la **Figura 8**, que se desarrolla a continuación: se inyectó la muestra en la columna, quedando retenidas las β -LG bovinas existentes en la muestra; como segundo anticuerpo se empleó un anti- β -LG bovina desarrollado en conejo, quedando unido a las β -LG bovinas. Se realizó una segunda incubación con un tercer anticuerpo, en este caso un anti-IgG leporino desarrollado en cabra marcado con una enzima, la fosfatasa alcalina (ALP). Como sustrato de la reacción se empleó para-nitrofenil-fosfato (PNPP), que produce para-nitrofenol (PNP) como producto de la reacción, detectable a 405 nm en la célula del detector cromatográfico.

Como fase móvil de unión se utilizó TBS (tampón tris salino) pH 7 con 0.1% de Brij 35 y 0.1% de ovoalbúmina (OVA); como fase móvil de detección Tris 0.1 M, pH 9, MgCl_2 5 mM y como solución de desorción para la reutilización de la columna se empleó glicina 0.1 M, HCl 0.05 M, pH 2.5.

El equipo utilizado fue un HPLC (LKB), compuesto por dos bombas modelo 2150 y un controlador modelo 2152. Se utilizaron 4 válvulas Rheodyne de 6 vías. Se emplearon dos detectores, uno de longitud de onda fija, modelo 440 (Waters) y uno de longitud variable modelo LC-95 UV/Visible (Perkin-Elmer). Los datos fueron adquiridos en el procesador System Gold (Beckman), a través de una interfase modelo 406 (Beckman).

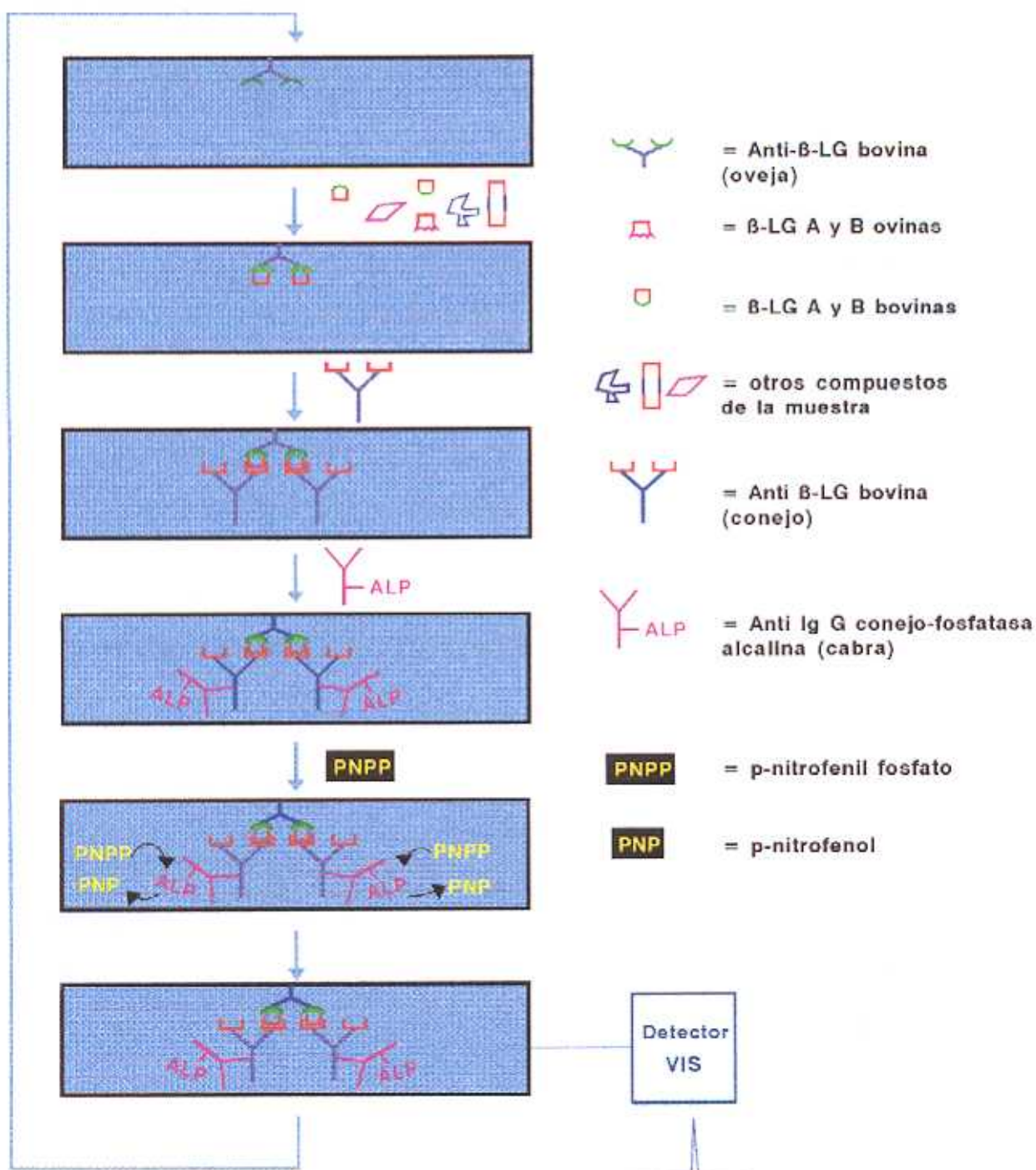


Figura 8: Procedimiento de inmunocromatografía ensayado

2.4.7. Western blotting

El Western blotting incluye tres etapas: 1) una separación electroforética de proteínas en gel, 2) transferencia de las mismas a una membrana adecuada y 3) detección de proteínas específicas en la membrana por inmunoadsorción de anticuerpos específicos.

Separaciones electroforéticas previas a la transferencia

• Isoelectroenfoque en PhastSystem®

La etapa de IEF se llevó a cabo en PhastSystem® como se describió anteriormente en el apartado 2.2.4.

• PAGE nativa en PhastSystem®

Se realizó en PhastSystem®, empleando geles comerciales Homogeneous 20% y tiras de electrodos para PAGE nativa (Native Buffer strips, Pharmacia). Se siguió la Nota de Aplicación nº 121 del Manual del equipo, aunque alargando el último paso, dejando correr las muestras hasta 180 Vh, como se indica en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Condiciones eléctricas de PAGE nativa de proteínas de suero en PhastSystem®.

	TENSIÓN (V)	INTENSIDAD (mA)	POTENCIA (W)	TEMPERA TURA(°C)	VOLT. HORA
PRE-ELECTROFORESIS	600	12.5	3.5	15	80
APLICACIÓN MUESTRA	600	12.5	3.5	15	2
ELECTROFORESIS	600	12.5	3.5	15	180

• Tinción de las placas de electroforesis e isoelectroenfoque

Siempre que se realizaba un Western Blotting, se corrieron dos placas de electroforesis simultáneamente, una de las cuales seguía el proceso propio del Western Blotting y otra se tiñó con tinción de plata siguiendo las instrucciones del

manual del PhastSystem®, con los reactivos comerciales del “Silver Kit” (Pharmacia).

■ **Transferencia y reconocimiento inmunológico**

Se siguió el procedimiento descrito a continuación (**Figura 9**). Después de PAGE o IEF, las proteínas fueron transferidas por difusión, durante 10 minutos del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0.45- μ m de diámetro de poro, previamente incubada durante 10 minutos en un tampón de transferencia [tris(hidroximetil)amino-metano 20 mM, glicina 150 mM y metanol al 20%]. Posteriormente a la transferencia se incubó durante 30 minutos en una solución de gelatina-PBS [1% gelatina, 20% PBS (4.5% NaCl y 3.9% NaH₂PO₄, pH 7) y 0.2% Triton X-100]. La inmunodetección fue realizada siguiendo el método de Tsang y col. (1983) ligeramente modificado como se explica a continuación. Como primer anticuerpo se utilizaron antisueros policlonales anti β -LG bovina desarrollados en conejo. Se estudiaron antisueros comerciales y antisueros cedidos generosamente por el Profesor M. Calvo de la Universidad de Zaragoza. La membrana de nitrocelulosa se incubó en una solución de 25 μ l de primer anticuerpo en 8 ml de solución de PBS-gelatina, durante 45 min. Después de tres lavados con agua, se realizaron tres nuevos lavados con solución de PBS-gelatina y posteriormente una segunda incubación durante 45 minutos con 25 μ l de un anticuerpo policlonal marcado, diluido en 8 ml de PBS-gelatina. El segundo anticuerpo marcado fue anti-IgG de conejo desarrollado en cabra marcado con peroxidasa. La membrana de nitrocelulosa fue lavada de nuevo tres veces con agua y una vez con solución de PBS-gelatina durante 10 minutos. Posteriormente se realizó un acondicionamiento de la membrana, con PBS diluido en agua (1:5) durante dos periodos de 10 min. El revelado se realizó con 25 ml de una solución de 0.05% de diaminobencidina y 6% de NiCl₂ al 1% en tampón Tris-HCl 0.1M, pH 7.5, al que se añadía en el último momento 0.8% de H₂O₂. El revelado se paró sumergiendo la membrana en agua cuando se llegaba a intensidades de fondo y bandas adecuadas.

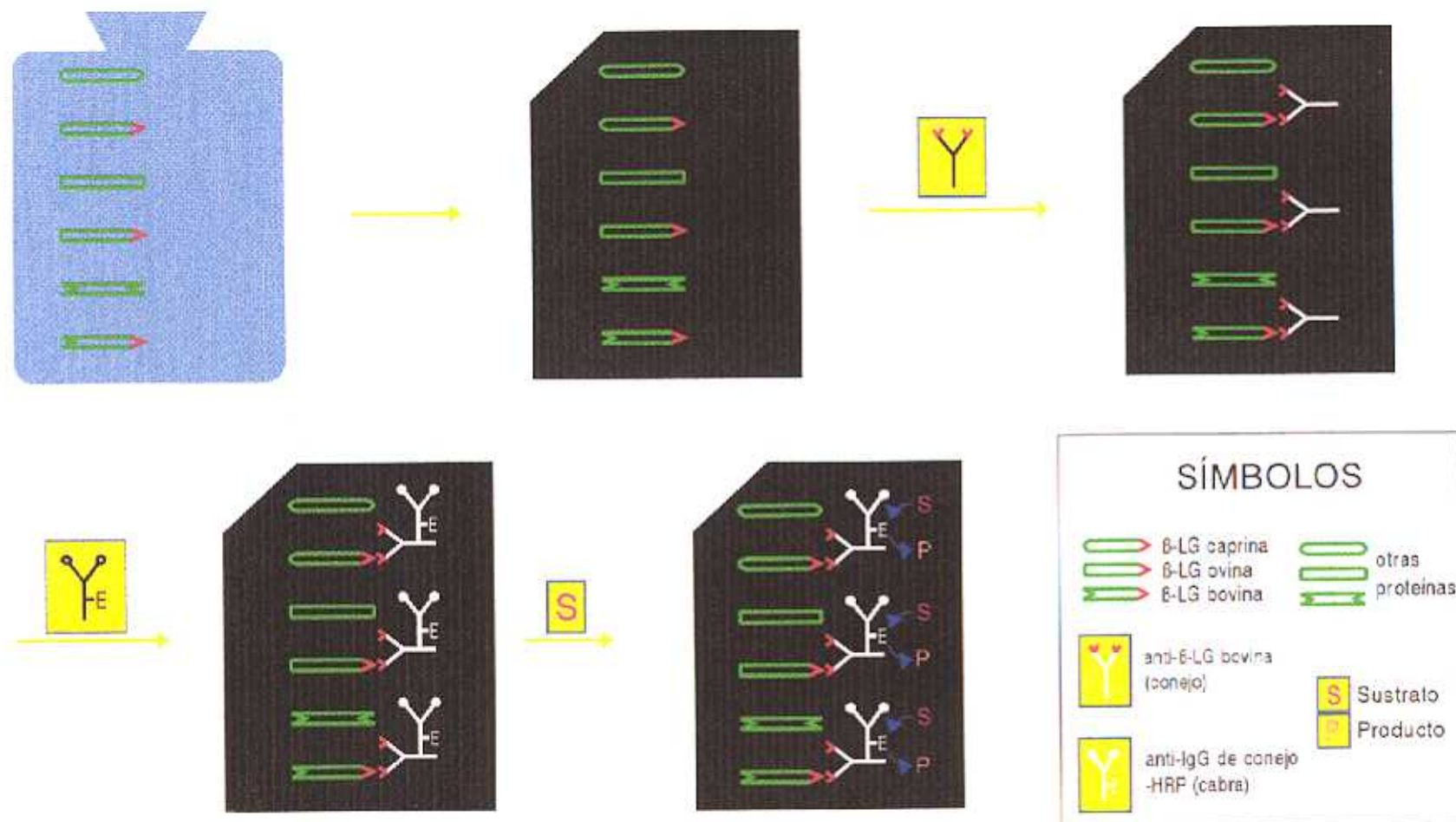


Figura 9: Procedimiento de Western Blotting desarrollado

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN CASEÍNICA DE LECHE Y QUESO DE LECHE DE OVEJA, VACA Y CABRA

3.1.1. Técnicas electroforéticas bidimensionales

En este tipo de electrorforesis se acoplan las ventajas de las técnicas monodimensionales que separan basándose en principios diferentes, en este caso la relación carga/masa y el punto isoelectrico.

En las **Figuras 10a), 10b) y 10c)** se muestran los perfiles obtenidos por electroforesis bidimensional, realizando en primera dimensión PAGE-urea a pH alcalino y en segunda dimensión isoelectroenfoco en geles finos, de un queso de leche de vaca, un queso de leche de oveja y un queso de leche de cabra, respectivamente. La electroforesis bidimensional, permite obtener un mapa peptídico complejo y característico de cada especie. Las diferentes caseínas y productos de degradación de las mismas, se extienden en distintas áreas del gel de segunda dimensión. En concreto con esta técnica se pueden separar los componentes de la α_{s1} -CN, y los de las α_{s2} -CN (que corresponden a los distintos grados de fosforilación de estas proteínas), separación que no es posible empleando únicamente PAGE-urea. La electroforesis bidimensional también permite separar las α_{s2} -CN y las γ -CN simultáneamente, mejorando así las posibilidades del IEF en geles finos con gradiente de pH 3.5-9.0.

3.1.2. Electroforesis capilar

Debido al gran número de caseínas y derivados caseínicos existentes en el queso, se recurrió a una técnica de análisis de elevado poder de resolución, como es la electroforesis capilar, con el fin de abordar la separación de este gran número de compuestos y obtener los perfiles electroforéticos para quesos elaborados con leche de vaca, oveja y cabra. Como se ha puesto de manifiesto, la transformación de caseínas en sus derivados en el queso, es debida a diferentes factores, entre los que hay que destacar la acción proteolítica del cuajo y de la plasmina.

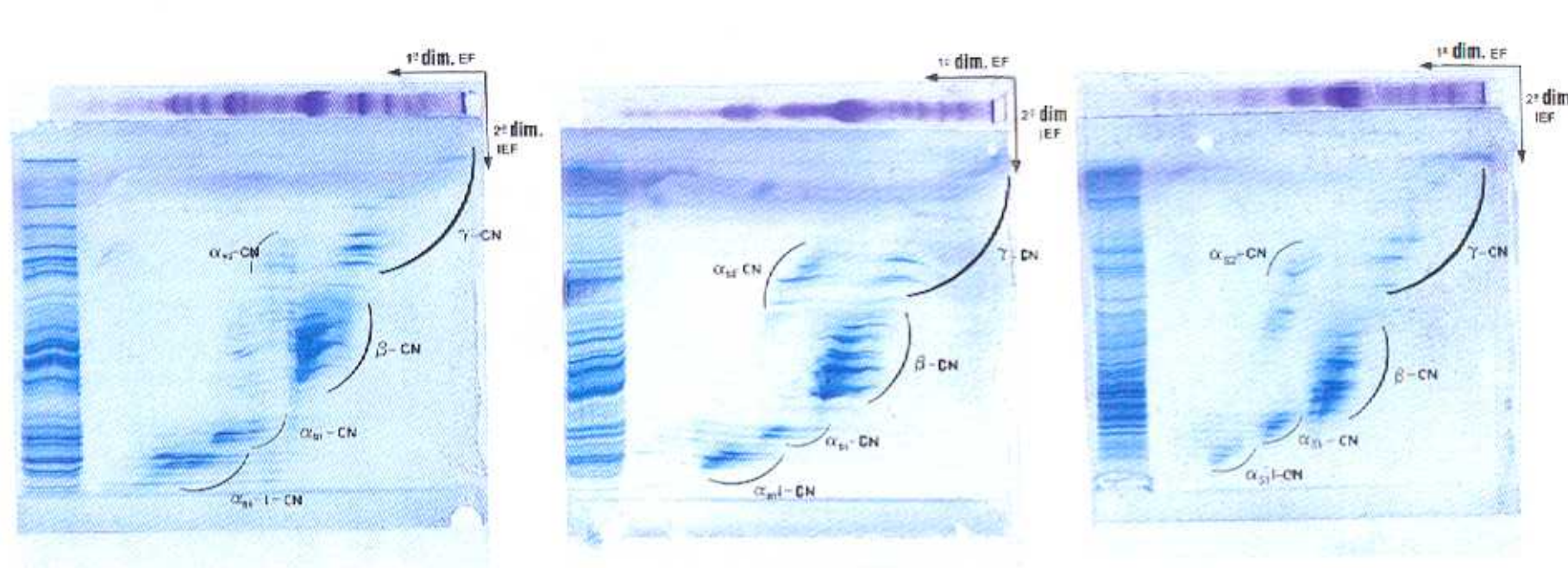


Figura 10: Separación mediante electroforesis bidimensional (1ª dim. PAGE- 2ª dim. IEF) de la fracción caseínica de a) queso de leche de vaca, b) de queso de leche de oveja y c) de queso de leche de cabra

Dentro de un estudio más amplio realizado en los últimos años en el laboratorio sobre el análisis de variantes genéticas de leche de diferentes especies por electroforesis capilar (Recio y col., 1997) y la aplicación de esta técnica al estudio de la proteólisis de la caseína de leche de vaca (Recio y col., 1997), se disponía de una serie de patrones de α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN y κ -CN de diferentes especies obtenidas por FPLC que nos han permitido identificar, en base a su tiempo de migración, las diferentes caseínas de leche de vaca, oveja y cabra. En la **Figura 11** se muestran los electroforegramas obtenidos por CE, de las caseínas de leche pasteurizada de vaca, oveja y cabra. El orden de migración de menor a mayor sería: α_{s2} -CN < α_{s1} -CN < α_{s0} -CN < κ -CN < β -CN A¹ < β -CN A², para la leche de vaca; α_{s2} -CN < α_{s1} -CN < κ -CN < β -CN 2 < β -CN 1 para la leche de oveja y α_{s2} -CN < α_{s1} -CN < κ -CN < β -CN 2 < β -CN 1, para la leche de cabra.

Del examen comparativo de estos electroforegramas, se puede deducir que aunque el orden de migración de las caseínas mayoritarias de las diferentes especies sea el mismo, hay variaciones en los tiempos de migración para una misma proteína en las diferentes especies. Así los tiempos de migración de las α_{s2} -CN, son menores para la leche de vaca, probablemente debido al diferente contenido en grupos fosfato, que para las leches de oveja y cabra. Cattaneo y col. (1996) han propuesto la diferencia en la migración de las α_{s1} -CN de las diferentes especies para la detección de mezclas, siendo los electroforegramas de estos autores confusos a pesar que la electroforesis capilar a pH ácido es capaz de separar proteínas que, como la α_{s0} -CN y la α_{s1} -CN, difieren en un grupo fosfato. Se observan además diferentes tiempos de migración para las κ -CN de las tres especies, de menor a mayor tiempo de migración κ -CN bovina < κ -CN ovina < κ -CN caprina. De esta última se obtiene separación de dos variantes genéticas, κ -CN A y κ -CN B. También existen diferencias en la movilidad electroforética de las β -CN, presentando las β -CN 1 ovina y caprina (que comigran) el mayor tiempo de migración.

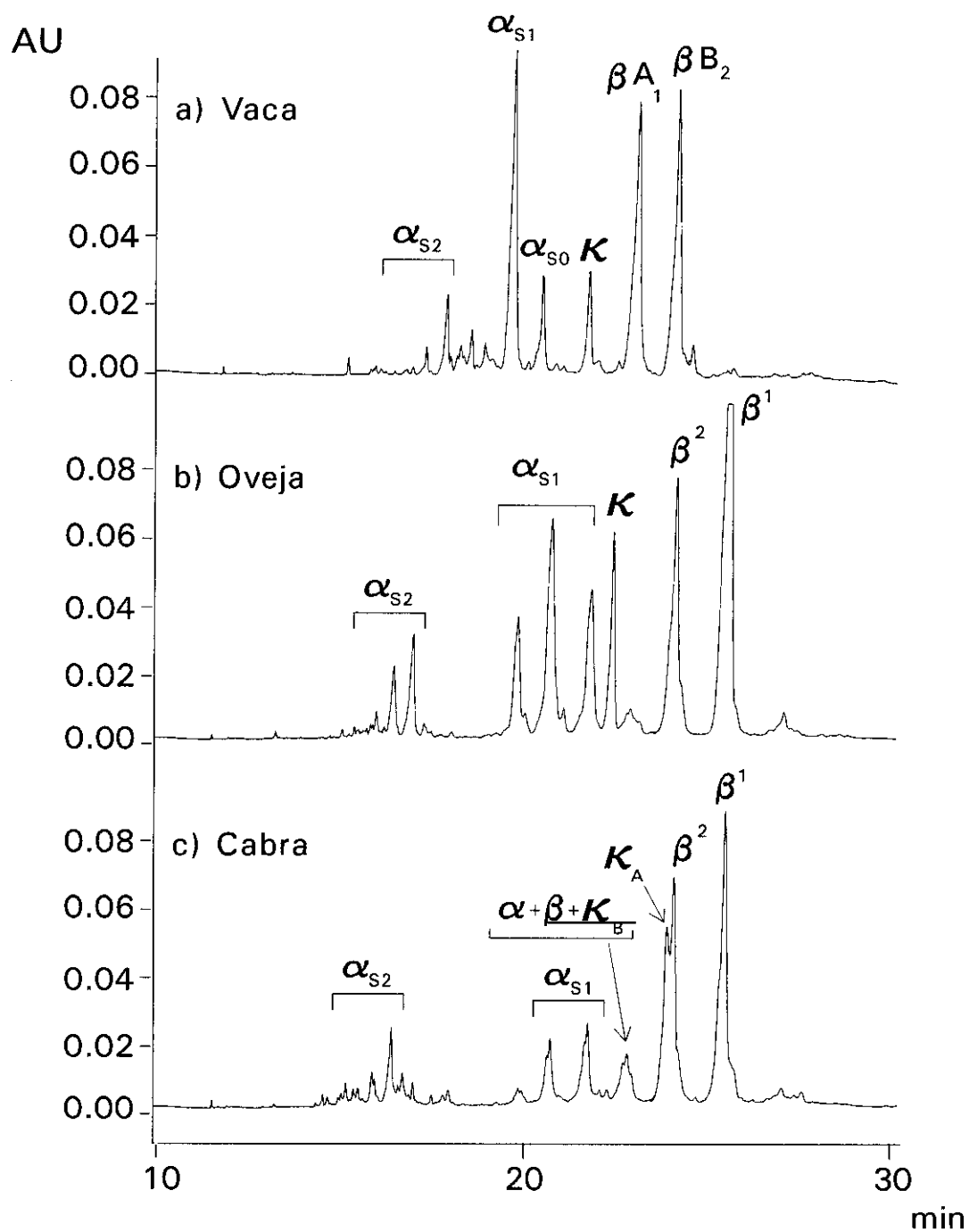


Figura 11: Separación mediante electroforesis capilar de la fracción caseínica de a) leche pasteurizada de vaca, b) leche pasteurizada de oveja, c) leche pasteurizada de cabra.

El empleo de técnicas electroforéticas de alta resolución como la CE ha permitido que la separación de las caseínas de leche y queso se pueda realizar en tiempos cortos y que se puedan realizar análisis cuantitativos. Cualitativamente aporta una información fundamental para el estudio de las caseínas y sus productos de degradación.

3.1.3. Sistemas modelo de las caseínas de leche y queso de oveja y cabra

La identificación de las diferentes caseínas en leche pura de vaca, de oveja y de cabra, nos ha permitido llevar a cabo la identificación de las mismas en quesos elaborados con leche pura de cada una de estas especies. Los productos de degradación de las caseínas de leche de vaca, por acción de la plasmina o el cuajo, se habían identificado con sistemas modelos realizados en trabajos anteriores en nuestro laboratorio (Recio y col., 1997).

En la **Figura 12** se muestran los electroforegramas de CE de caseína de leche de oveja, caseína de leche de oveja tratada con plasmina, caseína de queso de leche de oveja y caseína de queso de leche de oveja tratada con plasmina, y en la **Figura 13** los electroforegramas de CE de caseína de leche de cabra, caseína de leche de cabra tratada con plasmina, caseína de queso de leche de cabra y caseína de queso de leche de cabra tratada con plasmina, con el objetivo de diferenciar productos originados por la acción del cuajo o de la plasmina, y que puedan utilizarse como diferenciadores en quesos elaborados con mezcla de leche.

En las muestras tratadas con plasmina, los productos mayoritarios corresponden a los productos originados por la acción de la plasmina sobre la β -CN (Grufferty y Fox, 1988). Varios de ellos corresponden a la fracción conocida como γ -CN, así como otros productos (marcados con una S en las **Figuras 12 y 13**) que probablemente corresponden a componentes de proteosas-peptonas (Andrews y Alichanidis, 1983).

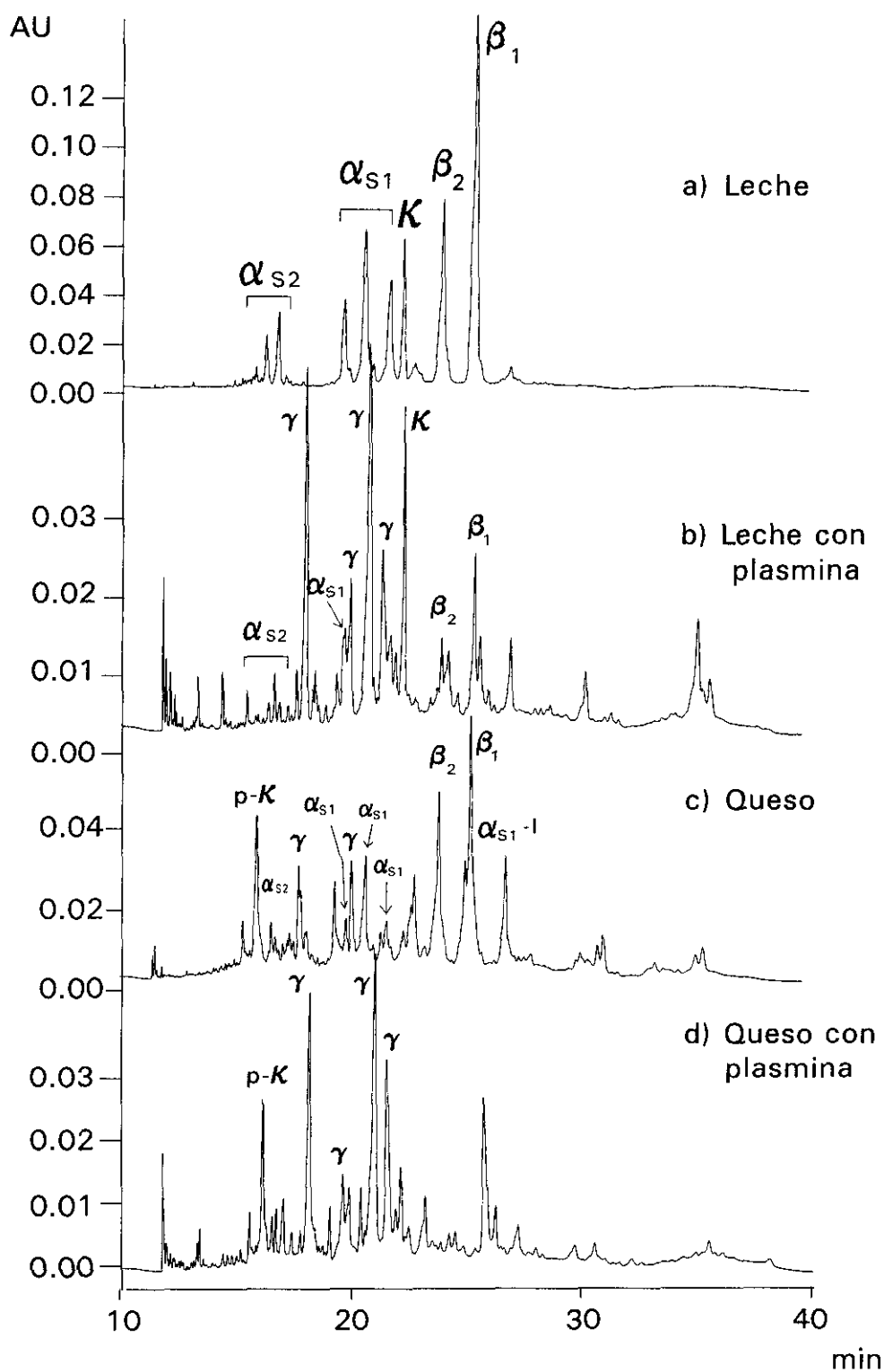


Figura 12: Electroforegramas de a) caseínas de leche de oveja, b) caseínas de leche de oveja tratadas con plasmina, c) caseínas de queso de leche de oveja y d) caseínas de queso de leche de oveja tratadas con plasmina.

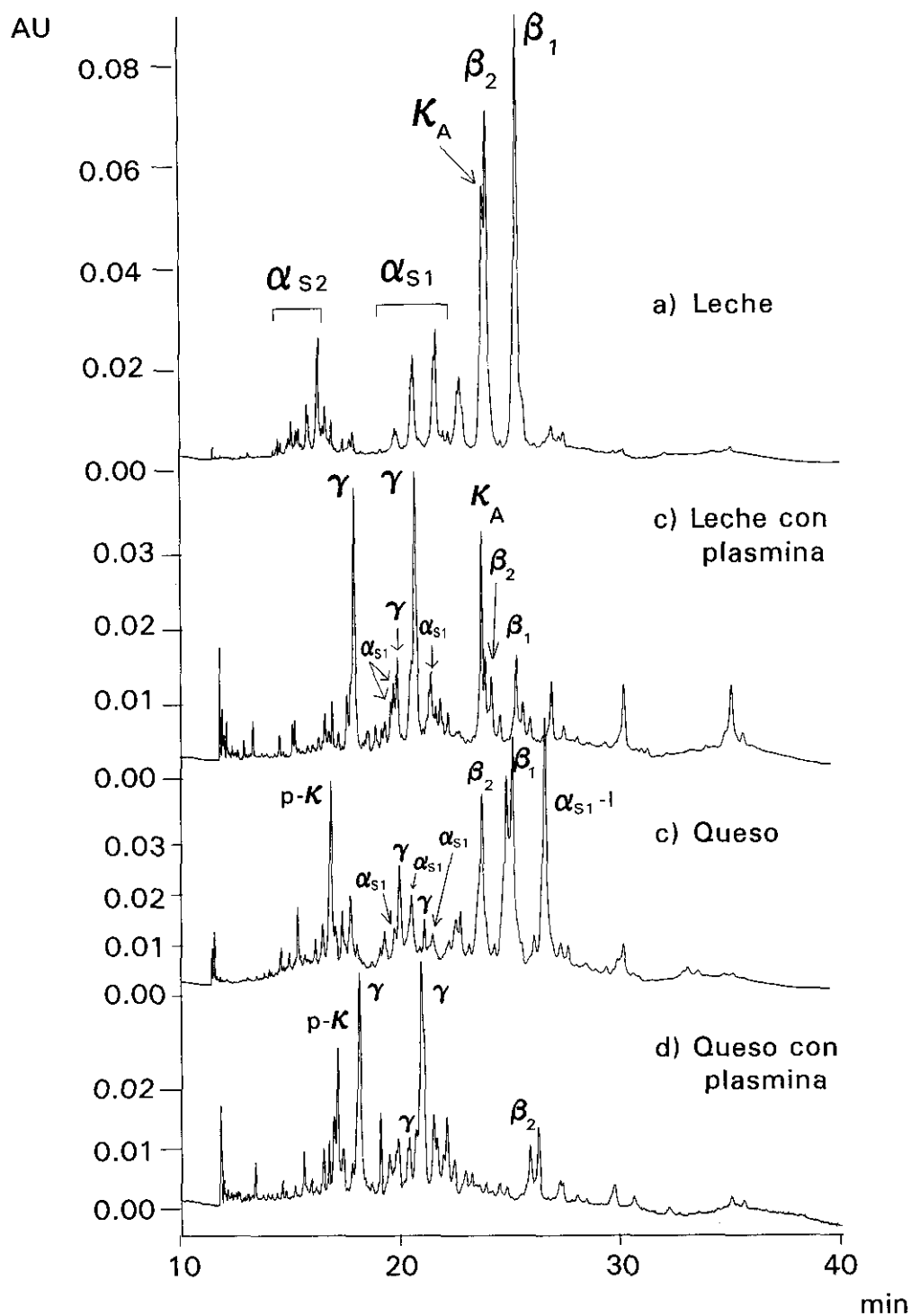


Figura 13: Electroforegramas de a) caseínas de leche de cabra, b) caseínas de leche de cabra tratadas con plasmina, c) caseínas de queso de leche de cabra y d) caseínas de queso de leche de cabra tratadas con plasmina.

En el queso (**Figura 14**) se observan la para- κ -CN y el péptido α_s -I, procedentes de la acción del cuajo sobre la κ -CN y la α_{s1} -CN respectivamente.

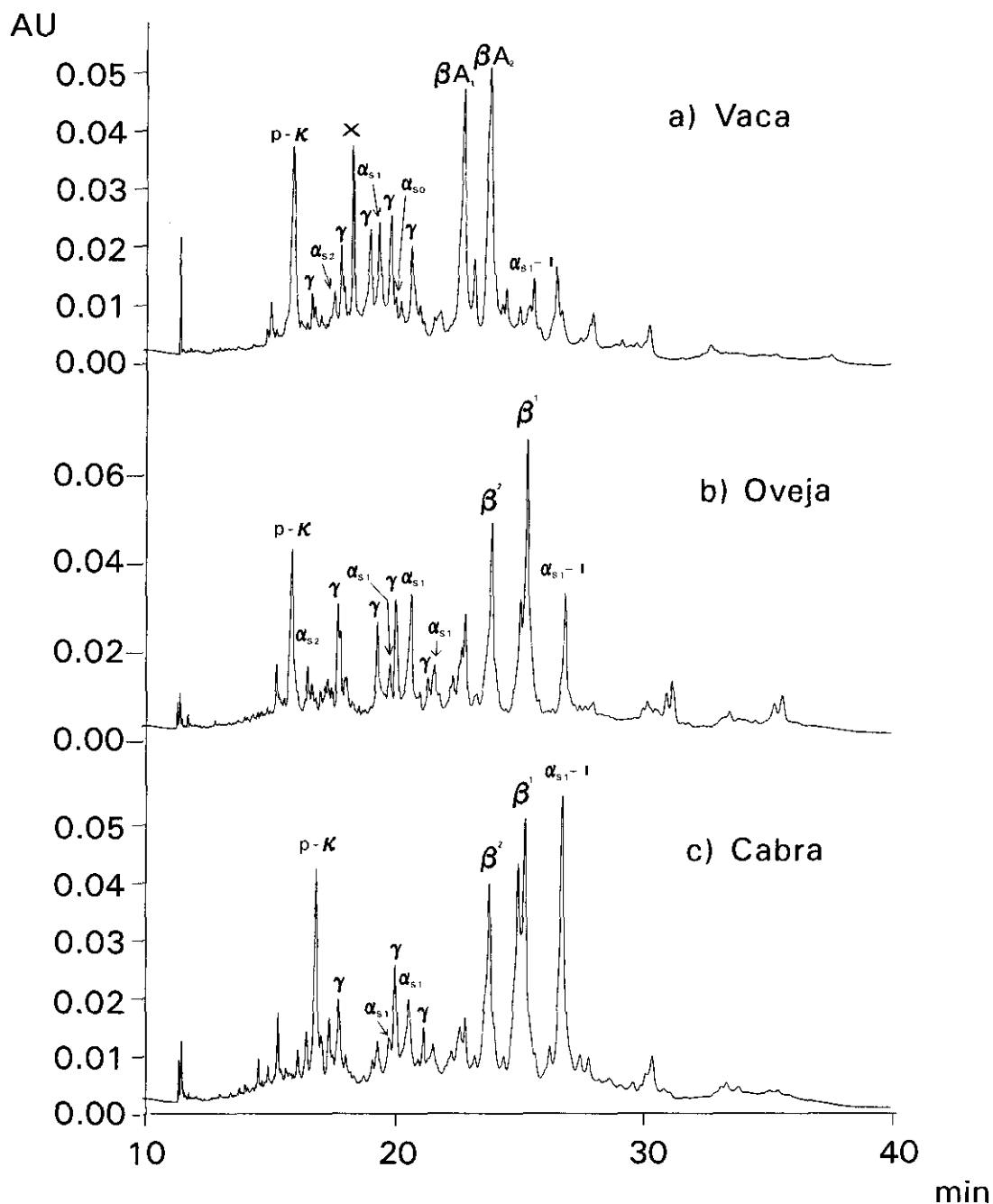


Figura 14: Electroforegramas de la fracción caseínica de a) queso de leche de vaca, b) queso de leche de oveja, c) queso de leche de cabra

Como se ha mostrado la elevada resolución de la electroforesis capilar permite llevar a cabo la separación de un elevado número de compuestos presentes en la fracción caseínica del queso, proporcionando perfiles electroforéticos característicos para los quesos elaborados con leche pura de vaca, leche pura de oveja y leche pura de cabra.

Una vez estudiados los sistemas modelo e identificados los productos de degradación, causados por efecto de la plasmina y el cuajo sobre los diferentes componentes caseínicos, se analizaron tres quesos: un queso Feta de leche de oveja, de 25 días de maduración, un queso elaborado con leche de oveja y cabra, de 21 días de maduración y un queso Ibérico, elaborado con leche de vaca, oveja y cabra, y de 180 días de maduración (**Figura 15**) pudiéndose identificar los picos mayoritarios correspondientes a quesos elaborados con leche de cada una de las especies. La mayor complejidad del perfil electroforético corresponde, como es lógico, al queso elaborado con mezcla de leche de vaca, oveja y cabra, que además fue madurado durante un largo periodo de tiempo.

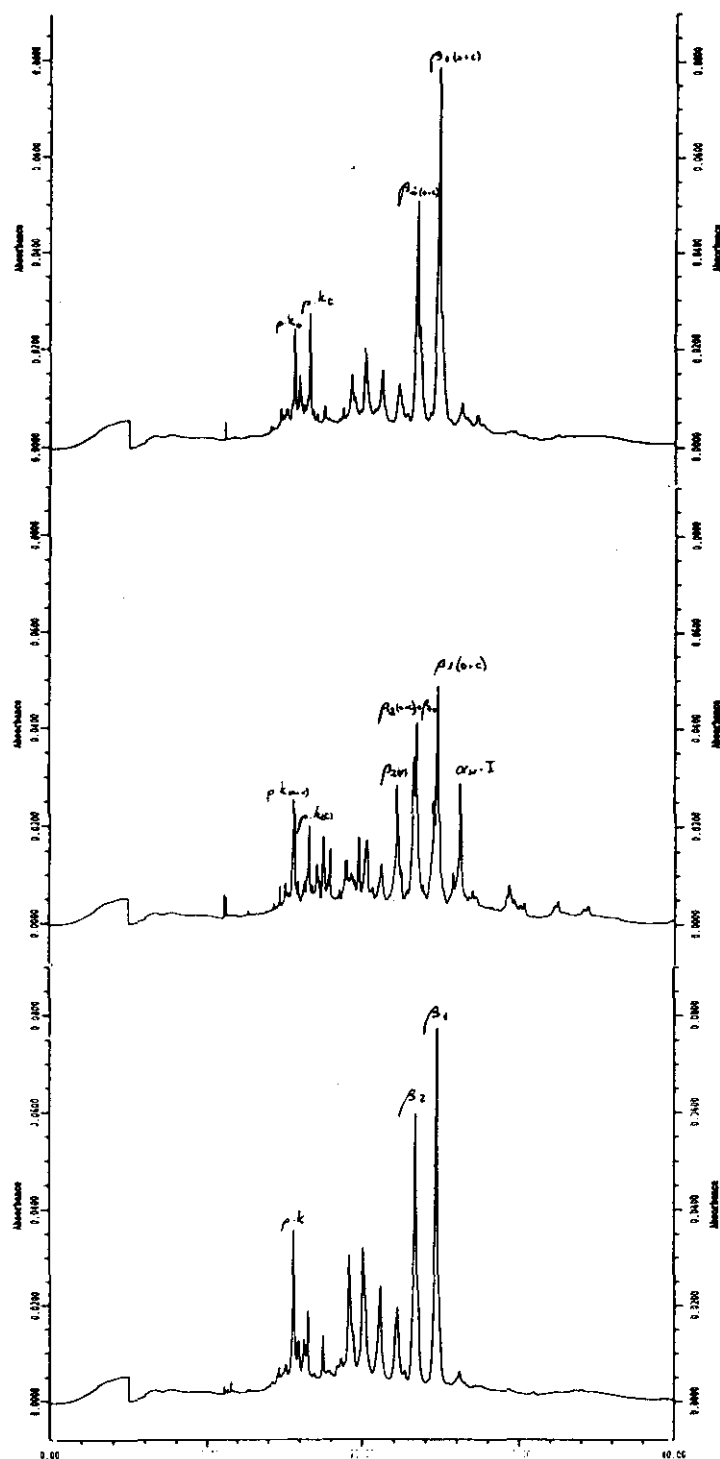


Figura 15: Electroforegramas de la fracción caseínica de a) queso Feta, de leche de oveja, b) queso de leche de oveja y cabra y c) queso Ibérico, de leche de oveja, vaca y cabra

3.2. CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN SEROPROTEICA DE LECHE Y QUESO DE OVEJA, VACA Y CABRA

3.2.1. Aplicación de técnicas estadísticas a la determinación de altos porcentajes de leche de vaca, cabra y oveja en quesos de mezcla.

En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio (Molina y col., 1995), se diseñó un modelo para determinar, mediante el análisis de la fracción seroproteica por métodos electroforéticos, los porcentajes de leche de vaca, cabra y oveja en quesos con proporciones entre el 25 y el 40% de cada especie. Sin embargo, el intervalo de porcentajes estudiados era demasiado estrecho y no contemplaba mezclas binarias, dejando al margen, tres denominaciones genéricas: "Queso Ibérico", "Queso Hispánico" y "Queso de la Mesta" (cuyas composiciones están descritas en el punto 1.1. de Introducción) por lo que sigue siendo necesario el desarrollo de métodos que permitan determinar los porcentajes de leche de cada una de las especies que intervienen en la composición de los quesos.

Isoelectroenfoque

En la **Figura 16** se muestra una placa de isoelectroenfoque en PhastSystem® de gradiente de pH 3-9 donde se observa una separación de las proteínas de suero de los quesos patrón: quesos de leche pura de vaca, de oveja y de cabra, así como 3 quesos elaborados con mezclas binarias (50:50, vaca/oveja; vaca/cabra; oveja/cabra respectivamente) y 4 quesos de mezclas ternarias de leche de estas tres especies (33:33:33; 66:17:17; 17:66:17 y 17:17:66 de vaca/oveja/cabra, respectivamente). Los porcentajes de leche de cada especie se seleccionaron de acuerdo al diagrama ternario descrito en el apartado 2.2.2 de Materiales y Métodos.

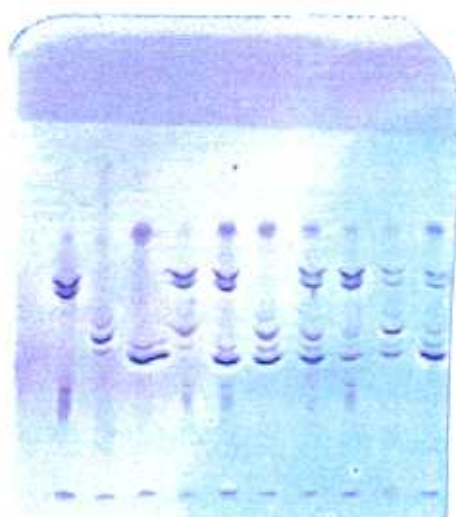


Figura 16: Perfil de isoelectroenfoque de los 10 quesos patrón. Calles 1-3: quesos puros de leche de vaca (v), leche de oveja (o) y leche de cabra (c) respectivamente; calles 4-6: mezclas de leche binarias 50:50 (v/o; v/c; o/c respectivamente); calles 7-10: mezclas de leche ternarias (33:33:33; 66:17:17; 17:66:17 y 17:17:66 de v:o:c, respectivamente).

En la **Figura 16** se observan los diferentes puntos isoeléctricos que presentan las β -lactoglobulinas (β -LG) de vaca, cabra y oveja, identificados según Amigo y col. (1992). En primer lugar, con mayor punto isoeléctrico aparece la β -LG caprina (pI 5.90), después las β -LG ovinas, B y A, (pI 5.87 y 5.73, respectivamente), y por último las β -LG bovinas, B y A, (pI 5.32 y 5.18, respectivamente). Estos puntos isoeléctricos son aproximados, pues dependen del gel empleado y de las condiciones de la carrera.

Las bandas específicas de cada especie, van a permitir estudiar posibles relaciones entre su intensidad y la composición del queso del que procedan, cuando nos interese determinar porcentajes elevados de leche de vaca, oveja y cabra. Las posibles relaciones se van a detectar mediante la aplicación de técnicas estadísticas. Otros autores han puesto de manifiesto que existe una relación lineal entre las intensidades de las bandas electroforéticas y el

porcentaje de leche de vaca, oveja y cabra que existe en su composición, pero a partir de porcentajes superiores al 50%, esta relación empieza a tener mayores errores (Rispoli y Saugues, 1989; Amigo y col., 1991). Laezza y col. (1992), obtienen una relación lineal hasta un 60% de leche de vaca en quesos de oveja.

Las placas fueron analizadas e integradas en un analizador de imagen (como se describe en apartado 2.2.4 de Materiales y Métodos) siendo consideradas las siguientes variables para el estudio:

- I.I. 1 y %I.I. 1: Intensidad integrada y porcentaje de intensidad integrada de la banda 1 correspondiente a β -Lg A de vaca.
- I.I. 2 y %I.I. 2: Intensidad integrada y porcentaje de intensidad integrada de la banda 2 correspondiente a β -Lg B de vaca.
- I.I. 3 y %I.I. 3: Intensidad integrada y porcentaje de intensidad integrada de la banda 3 correspondiente a β -Lg A de oveja.
- I.I. 4 y %I.I. 4: Intensidad integrada y porcentaje de intensidad integrada de la banda 4 correspondiente a β -Lg B de oveja.
- I.I. 5 y %I.I. 5: Intensidad integrada y porcentaje de intensidad integrada de la banda 5 correspondiente a β -Lg de cabra.

A los datos de intensidades integradas obtenidos por isoelectroenfoque de las proteínas de suero, se les aplicaron las técnicas estadísticas mencionadas en el punto 2.2.5. de Materiales y Métodos.

Regresión lineal

Mediante los métodos de regresión lineal se estudia la influencia del porcentaje de leche que interviene en la composición de los quesos (bloque X), en las intensidades integradas de las bandas o sus porcentajes (bloque Y), obtenidas por isoelectroenfoque.

• Modelo lineal simple

En este primer caso se estudian los valores de las intensidades integradas o sus porcentajes en función de los correspondientes porcentajes de leche de cada especie, aceptando un modelo lineal:

$$\text{I.I. (ó \% I.I.)} = a + b \% \text{ leche}$$

y más concretamente: I.I. 1 + I.I. 2 (ó \% I.I. 1 + \% I.I. 2), bandas que son específicas de leche de vaca, en función del porcentaje de leche de vaca, I.I. 3 + I.I. 4 (o sus porcentajes), que son específicas de leche de oveja, en función de los porcentajes de leche de oveja, e I.I. 5 (o su porcentaje) que es específica de leche de cabra, en función del porcentaje de leche de cabra.

En la **Tabla 10** se muestran los resultados obtenidos de la aplicación de la regresión lineal simple [(ordenada en el origen (a), pendiente (b), coeficiente de determinación (R^2) y desviación estándar residual (s)], a los datos de intensidades y porcentajes de leche en los 10 quesos patrón.

En la tabla se observa que para la leche de vaca, la mejor relación lineal de dependencia, se obtiene con la suma de las intensidades integradas correspondientes a las β -Lg de leche de vaca en función del porcentaje de leche de la misma en los quesos ($R^2 = 0.976$). Lo mismo ocurre para la leche de cabra con la relación: intensidad integrada de la banda correspondiente a β -Lg de leche de cabra en función del porcentaje de leche de cabra en quesos ($R^2 = 0.963$). Sin embargo, para la leche de oveja, ambas relaciones de dependencia son similares ($R^2 = 0.896$, para las intensidades integradas y $R^2 = 0.902$, para los porcentajes de las intensidades integradas), aunque peor definidas desde un punto de vista predictivo que las de las otras dos especies.

Tabla 10. Resultados de la regresión para el modelo lineal simple

	I. I. = a + b %leche			%I. I. = a + b %leche		
	Vaca	Oveja	Cabra	Vaca	Oveja	Cabra
	I.I. 1 + I.I. 2	I.I. 3 + I.I. 4	I.I.5	%I.I. 1 +% I.I. 2	%I.I. 3 +% I.I. 4	%I.I.5
a	0.0079	0.0088	0.0020	0.0560	-0.0329	0.0173
b	0.0038	0.0015	0.0030	0.0106	0.0088	0.0094
R²	0.976	0.896	0.963	0.941	0.902	0.951
s	0.021	0.018	0.021	0.093	0.102	0.075

**a=ordenada en el origen; b= pendiente; R²=coeficiente de determinación;
s = desviación estándar residual.**

Estos resultados pueden verse gráficamente en la **Figura 17** se muestran los valores de las intensidades integradas (I.I.) de las diferentes bandas electroforéticas, o de los porcentajes de las intensidades integradas (%I.I.), frente a los porcentajes reales de leche en los quesos, junto con las rectas de regresión obtenidas.

• Modelo de superficie de respuesta

En el segundo caso estudiamos la influencia del tipo de leche que interviene en la composición de los quesos en las intensidades de las bandas electroforéticas a través del siguiente modelo de superficie de respuesta:

$$I.I. \text{ (ó \%I.I.)} = a_1\%V + a_2\%O + a_3\%C + a_{12}\%V\%O + a_{13}\%V\%C + a_{23}\%O\%C + a_{123}\%V\%O\%C + a_{11}(\%V)^2 + a_{22}(\%O)^2 + a_{33}(\%C)^2$$

que tiene en cuenta los porcentajes de leche de las tres especies, sus dobles y triple productos y sus cuadrados.

En la **Tabla 11** se recogen los resultados de la aplicación de la regresión lineal múltiple por pasos sucesivos (SMLR) a la suma de las intensidades integradas o sus porcentajes (I.I. o % I.I.) correspondientes a las leches de las tres especies, para el modelo anterior. Todos los coeficientes de regresión (a) son

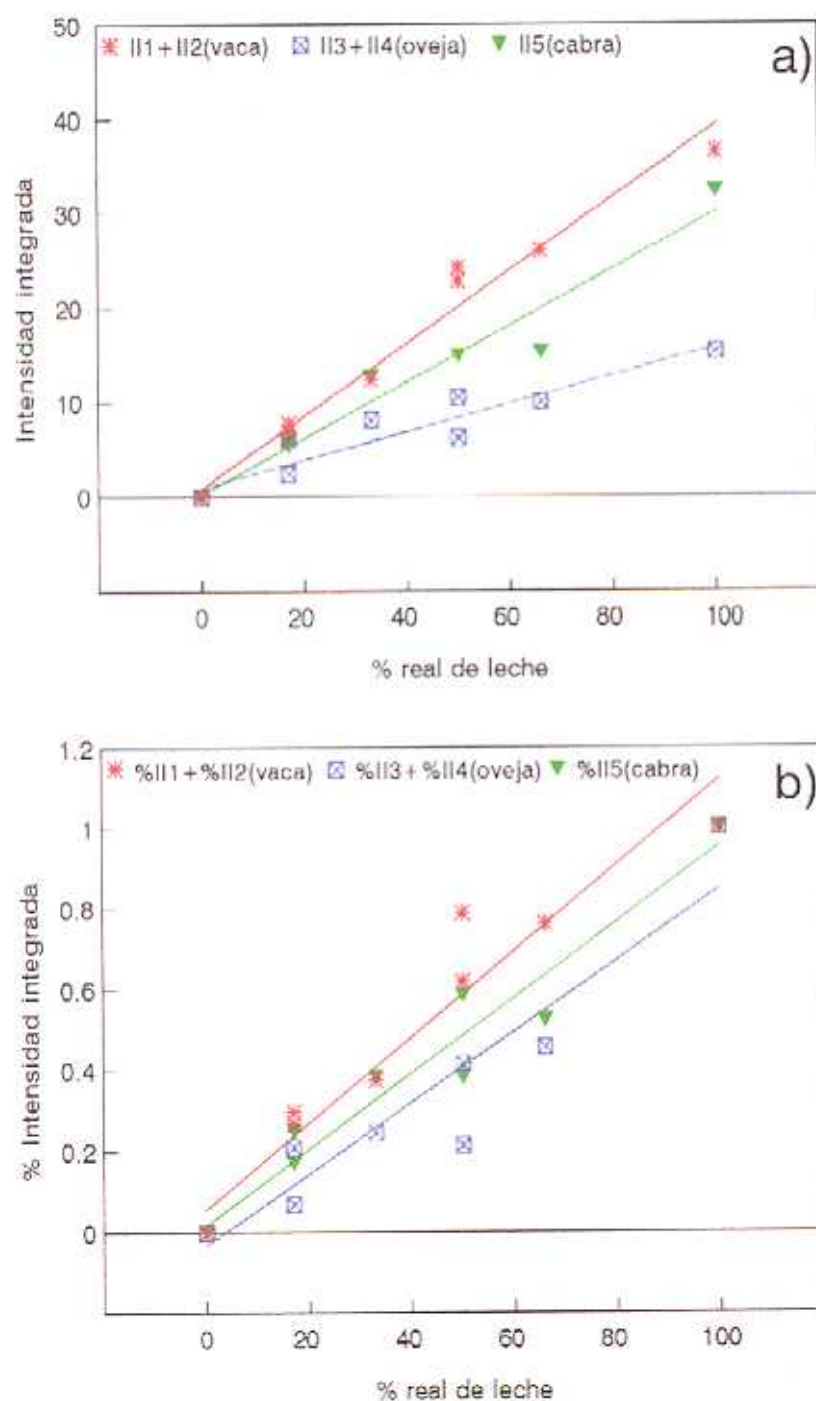


Figura 17: a) Valores de las intensidades integradas de las bandas electroforéticas (I.I.); b) valores de los porcentajes de las intensidades integradas (%I.I.), frente a los porcentajes reales de leche en los quesos patrón.

diferentes de cero ($p < 0.05$). Los mejores coeficientes de determinación se obtienen para la suma de intensidades integradas (I.I.) de las bandas correspondientes a leche de vaca ($R^2 = 0.999$) y para la correspondiente suma de porcentajes ($R^2 = 0.992$). Los coeficientes de determinación para las intensidades integradas o los porcentajes de intensidades integradas (I.I. o % I.I.) de las bandas correspondientes a los leches de cabra y oveja son similares y algo inferiores a los obtenidos para la leche de vaca.

Tabla 11: Resultado de la aplicación de regresión lineal múltiple por pasos sucesivos (SMLR) a las intensidades integradas o sus porcentajes en función de los porcentajes reales de leche, para el modelo de superficie de respuesta.

	I. I.			%I. I.		
	Vaca	Oveja	Cabra	Vaca	Oveja	Cabra
	I.I.1 + I.I.2	I.I.3 + I.I.4	I.I.5	%I.I.1+% I.I.2	%I.I.3+% I.I.4	%I.I.5
a ₁	0.540 x 10 ⁻²			0.104 x 10 ⁻¹		
a ₂	0.143 x 10 ⁻²					
a ₃	0.302 x 10 ⁻²				0.964 x 10 ⁻²	
a ₁₁	-0.176 x 10 ⁻⁴					
a ₁₂	0.951 x 10 ⁻⁴					
a ₁₃	0.672 x 10 ⁻⁵					
a ₂₂					0.967 x 10 ⁻⁴	
a ₂₃	0.168 x 10 ⁻⁴			0.832 x 10 ⁻⁴		
a ₁₂₃	-0.116 x 10 ⁻⁵					
R ²	0.999	0.983	0.982	0.992	0.989	0.977
s	0.0037	0.0113	0.0195	0.0534	0.0457	0.0716

a_i =coeficientes de regresión; R^2 =coeficiente de determinación; s = desviación estándar residual.

Las correspondientes curvas de isorrespuesta se recogen en la **Figura 18**, para la suma de las intensidades integradas de las bandas 1 y 2 (I.I.1 + I.I.2), propias de la leche de vaca (**18a**), para las intensidades integradas de las

bandas 3 y 4 (I.I.3 + I.I.4), propias de la leche oveja (**18b**) y para la intensidad integrada de la banda 5 (I.I.5), propia de la leche de cabra (**18c**). En estas figuras se pone de manifiesto el efecto de la interacción entre los porcentajes de leche de las tres especies sobre las intensidades integradas (I.I.) de las correspondientes bandas electroforéticas. Esta figura podría ser utilizada para la predicción aproximada de los porcentajes de leche en quesos a partir de las mencionadas intensidades para un queso problema incluido en la misma placa electroforética.

Regresión multivariante

Dentro de los métodos de regresión multivariante, hemos utilizado regresión en componentes principales (PCR) y regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS). Para la aplicación de estos métodos con fines predictivos se considera como bloque X las intensidades integradas (I.I.) correspondientes a las bandas electroforéticas de las leches de vaca, oveja y cabra (o sus porcentajes), y como bloque Y los porcentajes de leche de cada una de las tres especies.

• Regresión en componentes principales (PCR)

En la **Tabla 12** se recogen los resultados de la aplicación de la regresión en componentes principales (PCR) a los datos de las 10 muestras de quesos, considerando como bloque X las variables correspondientes a las bandas electroforéticas de las leches de vaca, oveja y cabra (I.I., ó %I.I., o sumas de %I.I.) y como bloque Y los porcentajes de leche de cada una de las tres especies. Estos resultados incluyen el número de componentes principales seleccionadas mediante validación cruzada (NC), y los valores de los estadísticos para juzgar la bondad del ajuste tanto en calibración [desviación estándar residual (s) y coeficiente de determinación (R^2)], como en predicción mediante validación cruzada [error medio en predicción mediante validación cruzada ($RMSEP_{cv}$)]. Los datos fueron previamente estandarizados.

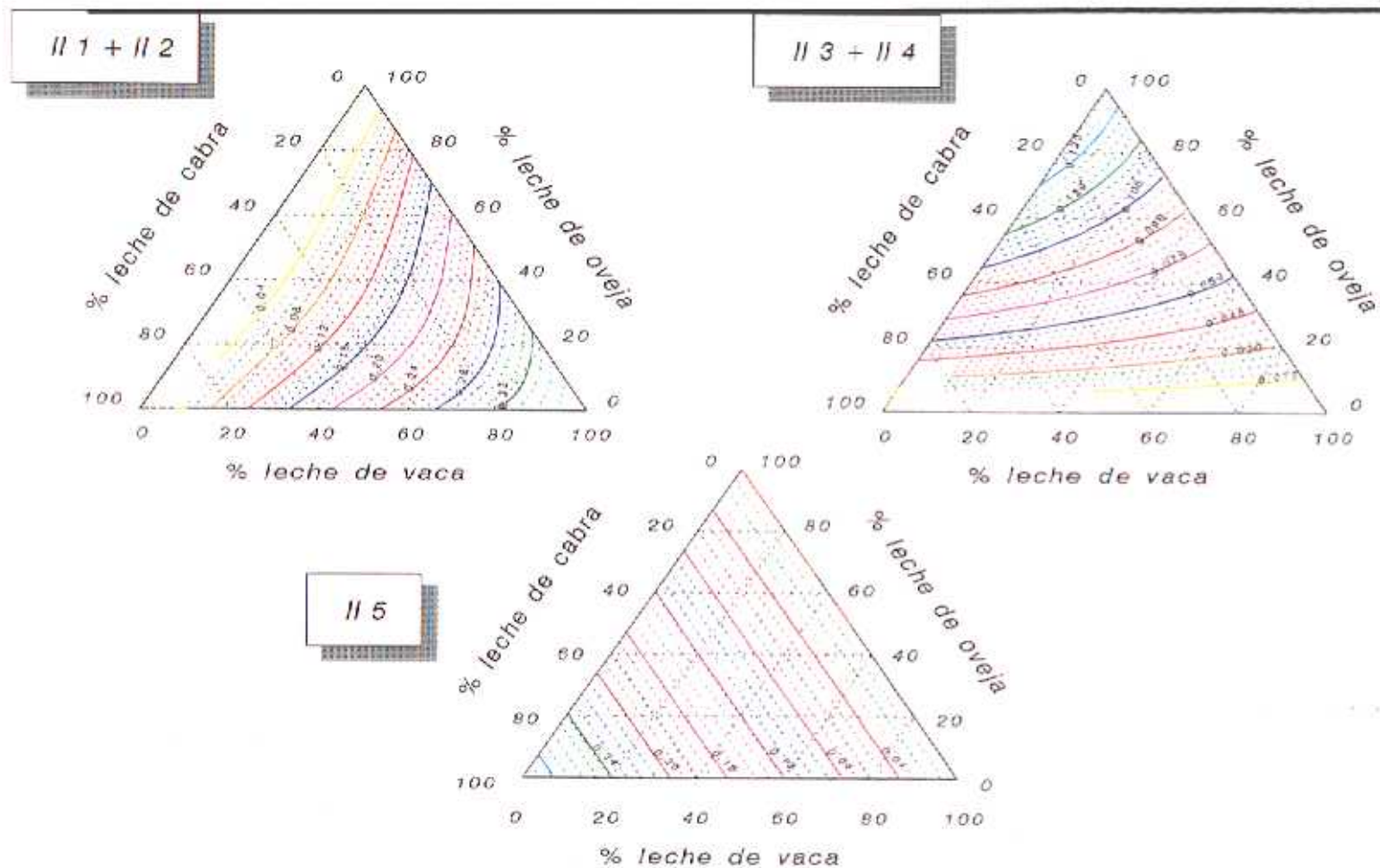


Figura 18: Curvas de isorrespuesta de las intensidades integradas (I.I.) en función de los porcentajes de leche en los quesos para el modelo de superficie de respuesta.

Tabla 12. Resultados de la aplicación de regresión en componentes principales para la predicción de los porcentajes reales de leche en los quesos, utilizando como variables del bloque X las intensidades integradas (I.I.), los porcentajes de intensidad integrada (%I.I.), y las sumas de los porcentajes de intensidad integrada, correspondientes a las bandas de la leche de cada especie.

	PCR								
	I.I.			% I.I.			(%I.I.1+%I.I.2) (%I.I.3+%I.I.4)%I.I.5		
	vaca	oveja	cabra	vaca	oveja	cabra	vaca	oveja	cabra
NC	3	3	3	3	3	3	2	2	2
R ²	0.976	0.977	0.985	0.947	0.954	0.977	0.942	0.915	0.956
s	6.3	6.1	5.0	9.3	8.7	6.2	9.1	11.0	7.9
RMSEP _{cv} (%)	7.7	8.4	7.8	13.8	14.7	8.2	12.40	17.1	10.20
RMSEP* _{cv} (%)	7.2	6.2	7.7	11.7	9.3	7.7	9.0	11.7	9.0

NC= número de componentes utilizadas; R²= coeficiente de determinación; s=desviación estándar residual; RMSEP_{cv} error medio en predicción mediante validación cruzada; RMSEP*_{cv} = error medio en predicción mediante validación cruzada para los 7 quesos de mezcla incluyendo siempre en el modelo los quesos puros de leche de cada especie.

En la tabla observamos que los menores errores medios en predicción (RMSEP_{cv}) se obtienen utilizando las intensidades integradas (I.I.) y que mejoran cuando se considera el RMSEP*_{cv}, de los 7 quesos que tienen en su composición leche de dos o tres de las especies, utilizando siempre para el cálculo de este modelo los quesos puros de cada especie.

En los otros dos casos presentados en la **Tabla 12**, es decir utilizando como variables los porcentajes de las intensidades integradas (% I.I.), y las sumas de los porcentajes de las intensidades integradas (% I.I.) de las bandas 1 y 2, correspondientes a leche de vaca; bandas 3 y 4, correspondientes a leche de oveja, y banda 5, correspondiente a leche de cabra, respectivamente, se obtienen resultados comparables a los resultados obtenidos al utilizar como

variables las intensidades integradas (I.I.), con coeficientes de determinación y desviación estándar residual (R^2 y s) similares, pero como se observa, los errores en predicción, son mayores (superiores al 8% en todos los casos).

En la **Figura 19** se muestra la representación de los porcentajes de leche de vaca, oveja y cabra calculados (y) (**Figura 19a**) y predichos por validación cruzada ($\hat{y}_{(i)}$) (**Figura 19b**), obtenidos mediante regresión en componentes principales (PCR), frente a los porcentajes reales de leche de las muestras de queso utilizando las intensidades integradas (primer caso contemplado en la **Tabla 12**).

• Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)

En la **Tabla 13** se muestran los resultados de la aplicación de la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), incluyendo el número de componentes seleccionadas mediante validación cruzada (NC), y los valores de los estadísticos para juzgar la bondad del ajuste tanto en calibración: desviación estándar residual (s) y coeficiente de determinación (R^2), como en predicción: error medio en predicción mediante validación cruzada ($RMSEP_{cv}$) y $RMSEP^*_{cv}$ (error medio en predicción mediante validación cruzada para los 7 quesos de mezcla incluyendo siempre en el modelo los quesos puros de leche de cada especie). En la tabla aparecen estos valores cuando se utilizan: 1) las intensidades integradas (I.I.); 2) los porcentajes de intensidades integradas (% I.I.) y 3) la suma de los porcentajes de las intensidades integradas de las bandas 1 y 2, la suma de los porcentajes de intensidades integradas de las bandas 3 y 4 y el porcentaje de intensidad integrada de la banda 5. Los dos conjuntos de datos X e Y fueron previamente estandarizados.

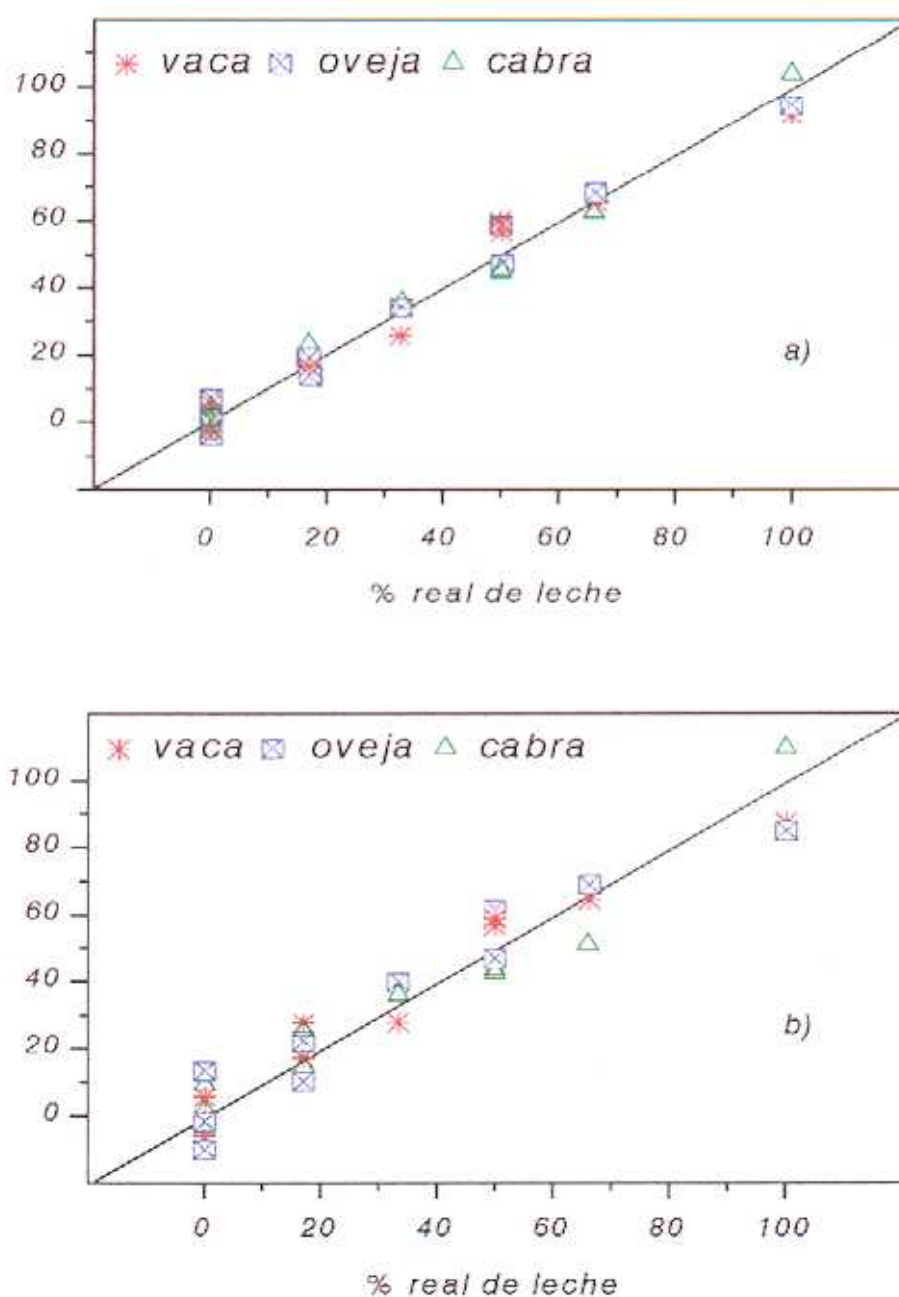


Figura 19: Porcentajes de leche de vaca, oveja y cabra calculados (a) y predichos por validación cruzada (b) mediante regresión por componentes principales (PCR), en función de los porcentajes reales de leche en los quesos patrón.

Tabla 13. Resultados de la aplicación de la regresión por mínimos cuadrados parciales, para la predicción de los porcentajes reales de leche en los quesos, utilizando como variables del bloque X las intensidades integradas (I.I.), los porcentajes de intensidad integrada (%I.I.), y las sumas de los porcentajes de intensidad integrada, correspondientes a las bandas de la leche de cada especie.

	PLS								
	I.I.			% I.I.			(%I.I.1+%I.I.2) (%I.I.3+%I.I.4)%I.I.5		
	vaca	oveja	cabra	vaca	oveja	cabra	vaca	oveja	cabra
NC	3	3	3	3	3	3	2	2	2
R²	0.929	0.941	0.941	0.949	0.958	0.976	0.943	0.914	0.956
s(%)	6.3	6.0	5.0	9.2	8.3	6.2	9.0	11.0	7.9
RMSEP_{cv} (%)	7.7	11.1	7.4	11.8	17.1	12.5	12.98	18.49	10.26
RMSEP*_{cv} (%)	6.5	5.9	6.2	9.1	7.4	8.7	9.4	12.0	8.1

NC= número de componentes utilizadas; **R²=** coeficiente de determinación; **s=**desviación estándar residual; **RMSEP_{cv}=**error medio en predicción mediante validación cruzada; **RMSEP*_{cv} =** error medio en predicción mediante validación cruzada para los 7 quesos de mezcla incluyendo siempre en el modelo los quesos puros de leche de cada especie.

En la tabla observamos que los menores errores medios en predicción mediante validación cruzada (RMSEP_{cv}), se obtienen cuando se utilizan las 5 intensidades integradas (I.I) y que mejoran cuando se considera este mismo error para los 7 quesos que tienen en su composición leche de dos o tres de las especies, utilizando siempre para el cálculo de este modelo los quesos puros de cada especie (RMSEP*_{cv}).

En los otros dos casos presentados en la **Tabla 13**, es decir utilizando como variables los porcentajes de intensidades integradas (% I.I.), y las sumas de los porcentajes de intensidades integradas (% I.I.) de las bandas 1 y 2, específicas de leche de vaca; de las bandas 3 y 4, específicas de la leche de oveja y de la banda 5, específica de la leche de cabra, respectivamente, se obtienen

resultados comparables a los resultados obtenidos al utilizar como variables las intensidades integradas (I.I), con R^2 y s, similares, pero como se observa, los errores en predicción, son mayores (superiores al 10% en todos los casos).

En la **Figura 20a)** se representan los valores calculados (y_i) y en la **Figura 20b)** los valores predichos por validación cruzada mediante regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), ($\hat{y}_{(i)}$) frente al porcentaje real de leche de las muestras de queso para el primer caso contemplado en la **Tabla 13**.

El hecho de obtener los mejores resultados con las intensidades integradas de las bandas electroforéticas, parece lógico, pues como ya demostraron Amigo y col. (1991), estas intensidades son lineales con los porcentajes de leche presentes en la composición del queso. Los errores superiores al 5% podrían deberse a los quesos patrón con porcentajes de leche de cualquiera de las tres especies superiores al 50%.

Los resultados obtenidos por PCR son comparables a los obtenidos por PLS.

Aplicación de las distintas técnicas de regresión a la determinación de los porcentajes de leche de vaca, oveja y cabra, en un queso elaborado con leche ultrafiltrada

La información aportada por los 10 quesos patrón, resulta imprescindible para la predicción de los porcentajes de leche en quesos de mezcla, de composición desconocida, y por tanto deben estar presentes en la placa electroforética donde se haga la separación del queso problema. El método electroforético empleado (IEF 3-9 en PhastSystem®) permite el análisis de hasta 12 muestras a la vez, por lo que en un sólo ensayo, se permitiría predecir, la composición de dos quesos problema.

Como aplicación de los distintos métodos de regresión utilizados, se realizó la predicción de los porcentajes de leche de vaca, oveja y cabra en un queso

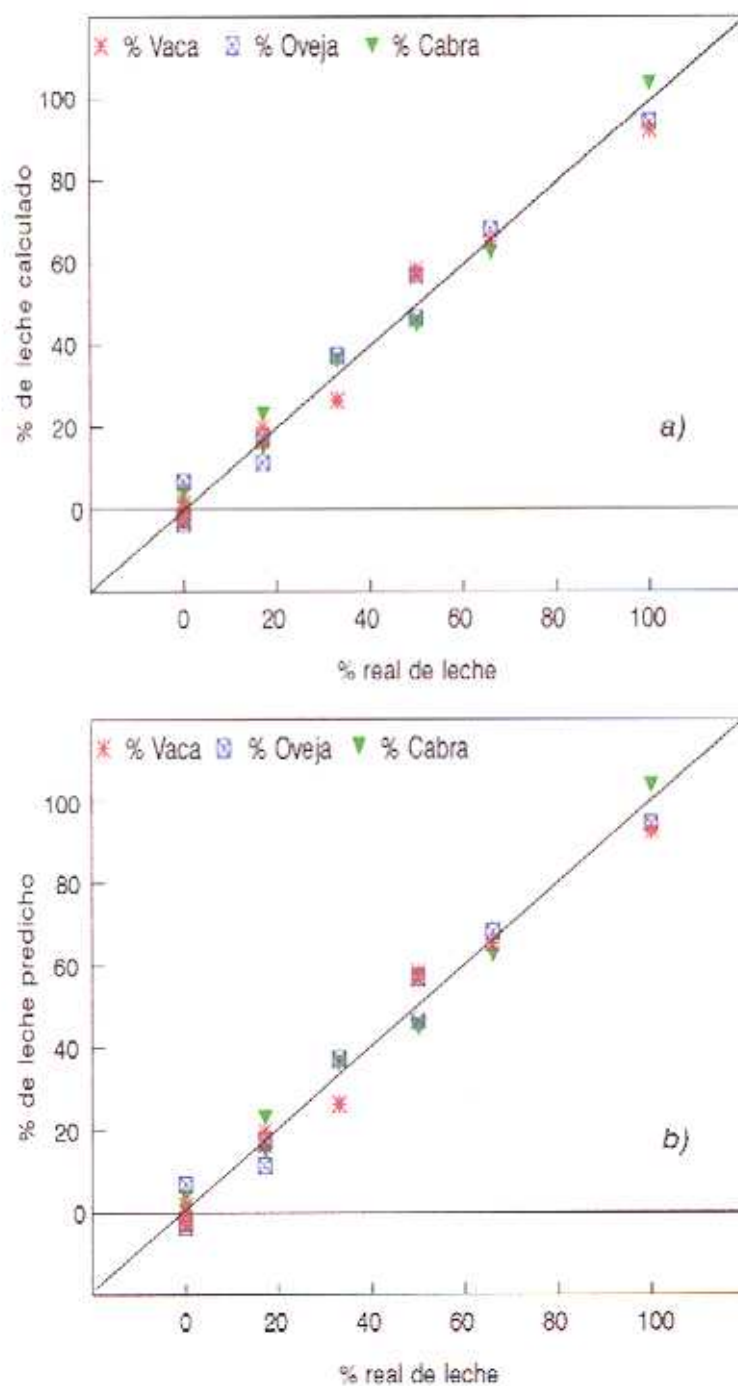


Figura 20: Porcentajes de leche de vaca, oveja y cabra calculados (a) y predichos mediante validación cruzada (b) mediante regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), en función de los porcentajes reales de leche en los quesos patrón.

elaborado con leche ultrafiltrada, de composición real: 55% de leche vaca, 15% de leche de oveja y 30% de leche de cabra.

En la **Tabla 14** se muestran las predicciones obtenidas para este queso aplicando los distintos modelos de regresión estudiados: regresión lineal simple (RLS), superficie de respuesta, regresión en componentes principales (PCR) y regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), junto con la distancia euclídea entre el punto que representa la composición real y el punto que corresponde a la composición predicha que nos permite juzgar qué método realiza una mejor predicción. En todos estos casos la mejor predicción se obtuvo considerando las sumas de los porcentajes de las intensidades de las bandas propias para la leche de cada especie [(%I.I.1+ % I.I. 2), (%I.I. 3+% I.I. 4) y % I.I. 5].

Tabla 14: Resultado de la aplicación de los distintos métodos de regresión para la predicción de los porcentajes de leche de vaca, oveja y cabra en un queso fabricado con leche ultrafiltrada, de proporciones conocidas (55% de leche de vaca; 15% de leche de oveja; 30% de leche de cabra).

	Predicción de los porcentajes			
	Leche de Vaca	Leche de Oveja	Leche de Cabra	Distancia
RLS	58	10	24	0.085
Superf. resp	50	18	32	0.0616
PCR	57	17	26	0.0489
PLS	57	17	26	0.0489

RLS: regresión lineal simple; PCR: regresión por componentes principales; PLS: regresión por mínimos cuadrados parciales

La menor distancia euclídea nos indica la mejor predicción, que como se observa corresponde a la regresión en componentes principales (PCR) y a la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).

En la **Figura 21** se representan las curvas de isorrespuesta obtenidas para el modelo de superficie de respuesta a partir de los quesos patrón para el queso problema. Teniendo en cuenta que los porcentajes de las intensidades integradas obtenidas después del análisis de las bandas electroforéticas del queso problema fueron: % I.I. 1= 43.2 ; % I.I. 2=23.1; % I.I. 3=7.4; % I.I. 4= 5.0; y % I.I. 5=21.4, se pueden predecir de forma aproximada, a partir de la figura, valores de 50, 18 y 32, para los porcentajes de leche de vaca, oveja y cabra respectivamente. Este método se puede considerar también como un buen método de predicción y su utilización parece ser más intuitiva, además la distancia euclídea de este método es comparable a la obtenida por regresión en componentes principales (PCR) o regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).

En quesos fabricados con la misma tecnología, se debe cumplir la relación lineal entre intensidad y porcentaje de leche, sin embargo no tiene por qué ser así para un queso elaborado con distinta tecnología. En un queso fabricado con leche ultrafiltrada, es decir, que ha sufrido una concentración de proteínas de suero, lo más probable es que no se ajuste a esa linealidad. Sin embargo estas diferencias se corrigen utilizando para la predicción los porcentajes de intensidades integradas de las bandas.

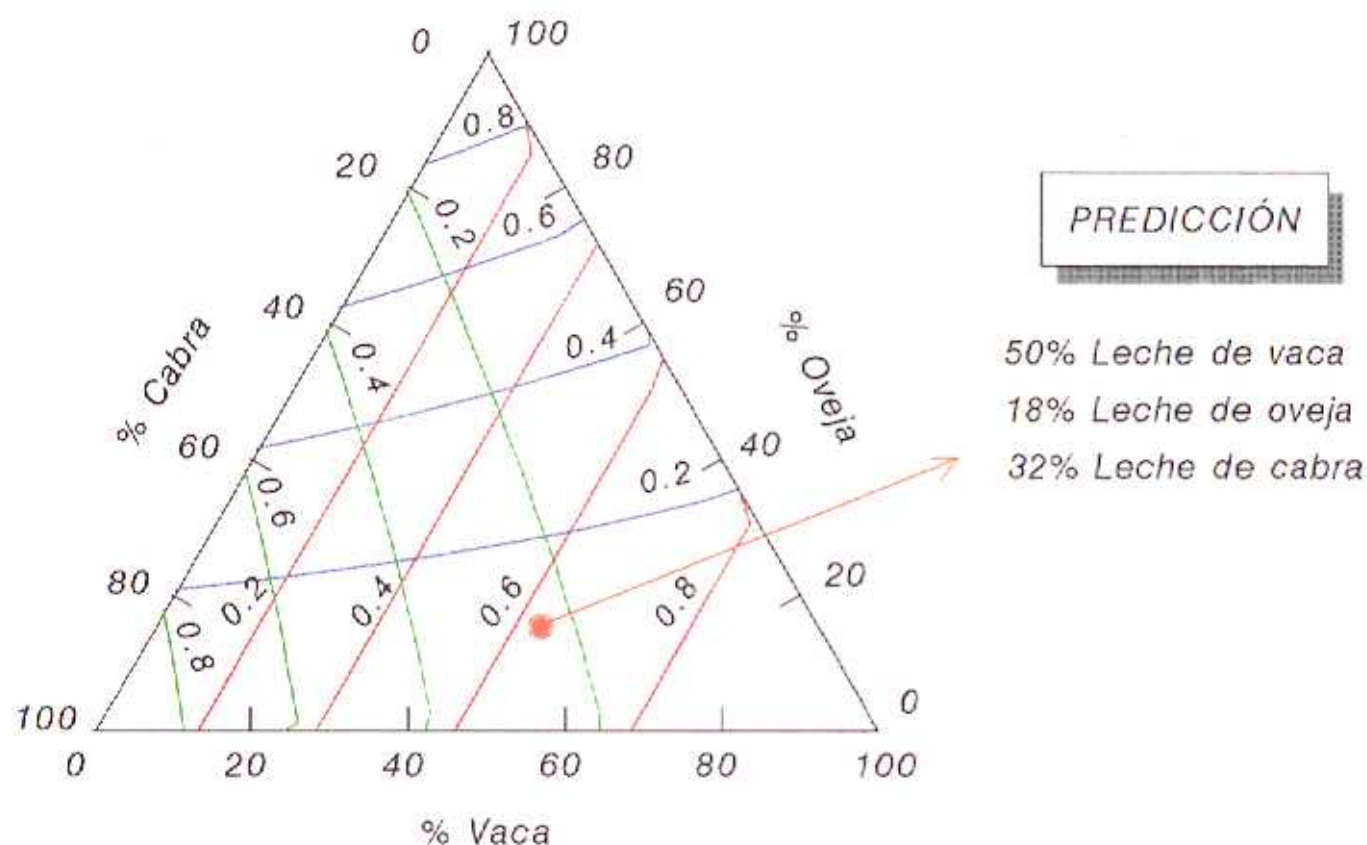


Figura 21: Curvas de isorrespuesta de los modelos de superficie de respuesta, utilizado para la predicción de los porcentajes de vaca, oveja y cabra de un queso fabricado con leche ultrafiltrada a partir de los modelos de superficie de respuesta estudiados.

3.2.2. Estudio de la fracción seroproteica de leche por electroforesis capilar

■ Selección de las condiciones experimentales

Uno de los principales problemas que se plantean en el análisis de proteínas mediante electroforesis capilar es la adsorción de la proteína sobre la pared de sílice del capilar. Estas adsorciones, que dan lugar a ensanchamientos de las bandas, pérdida de resolución, irreproducibilidad en el tiempo de migración y errores en la cuantificación, se deben principalmente a la interacción de las cargas negativas de los grupos silanoles de la sílice con las zonas de las proteínas cargadas positivamente. En este caso para disminuir estas interacciones electrostáticas se ha añadido sulfato sódico al tampón de separación, de modo que los iones alcalinos cargados positivamente compiten con las cargas positivas de la proteína para unirse a la pared. Esto, unido a que en las condiciones de pH estudiadas (pH 8.2) la carga neta de las proteínas estudiadas es negativa, hace que disminuyan las adsorciones no específicas. Además, hay que tener en cuenta que cuanto mayor es la fuerza iónica del tampón, menor es el potencial zeta, menor el flujo electroosmótico, y mayor la resolución. En la **Figura 22** se muestra una mezcla de estándares de α -LA, β -LG B y β -LG A en concentraciones similares a las de muestras reales, realizando la separación con tampón borato 100 mM; Na_2SO_4 30 mM, pH 8.2.

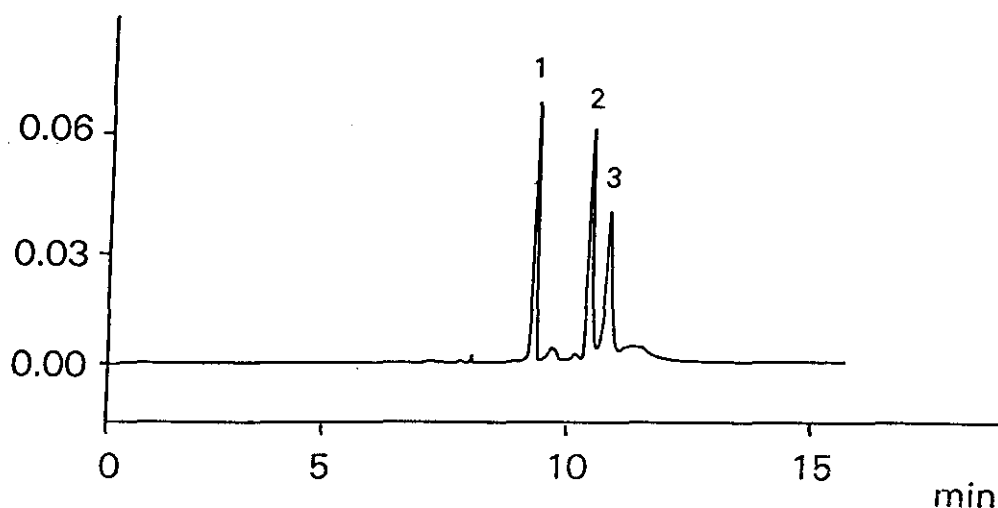


Figura 22 Separación de 1) α -LA, 2) β -LG B y 3) β -LG A. Separación a 7 Kv en capilar sin recubrir (75 μ m de I.D.; l=30 cm; L=37cm). Tampón bórico-borato 100 mM; Na_2SO_4 30 mM. Inyección por presión de nitrógeno (0.5 psi) durante 2s. $T^a=25^\circ\text{C}$. Detección a 214 nm.

• Acondicionamiento del capilar

El tratamiento del capilar entre inyección e inyección tiene una influencia decisiva sobre la reproducibilidad del tiempo de migración. Si quedan sustancias adsorbidas, éstas modifican la pared del capilar, y por tanto, al realizar la siguiente inyección las proteínas se encuentran en las paredes del capilar con unas zonas hidrófobas que antes no había, y con un capilar en el que se ha modificado su carga, y por tanto su flujo electroosmótico, de modo que varía la adsorción, el ensanchamiento de banda y el tiempo de migración de las proteínas de inyección a inyección. El método óptimo de acondicionamiento del capilar depende de diversos factores, destacando la naturaleza del tampón y de las muestras (**Tabla 15**).

Tabla 15: Coeficientes de variación (%RSD) de los tiempos de migración de las principales proteínas de suero de leche pasteurizada de vaca.

	PROTEÍNA		
	α -LA	β -Lg B	β -Lg A
Acondicionamiento de capilar no optimizado	4.20	4.92	5.20
Cambio de tampón cada 4 inyecciones	3.38	3.61	3.87
Acondicionamiento de capilar optimizado y cambio de tampón	2.45	2.68	2.70
Tiempo de migración relativo al patrón interno	0.74	1.03	1.03

Concretamente con el tampón borato-sulfato sódico empleado y para proteínas de suero de leches pasteurizadas, se ha comprobado que no reutilizando el tampón, con el fin de evitar posibles variaciones originadas por la electrolisis, y lavando el capilar durante 2 minutos con agua, 2 minutos con NaOH 0.05 N, y nuevamente 2 minutos con agua, secando 1 minuto con nitrógeno y acondicionando durante 4 minutos con tampón de separación, mejora notablemente la reproducibilidad de los tiempos de migración, pero el coeficiente de variación es aún superior al 2%. Si consideramos tiempos de migración relativos a un patrón, concretamente al péptido lisina-triptófano-lisina, se logra una mejora adicional de la reproducibilidad en la migración, con coeficientes de variación en torno al 1% o inferiores.

Al aplicar directamente el método de lavado descrito, a las muestras de leche cruda, se obtuvieron coeficientes de variación para los tiempos de migración, superiores a los obtenidos para leches pasteurizadas. Como se mencionó anteriormente el método óptimo de lavado del capilar depende de la naturaleza

de la muestra. En este caso para muestras de suero de leches crudas es necesario introducir una etapa adicional de 2 minutos de lavado con SDS 10%, previa a la secuencia de agua, sosa, agua.

Este hecho puede deberse a la adsorción de algunos componentes de la leche cruda sobre la pared capilar. Esta hipótesis se apoya por el hecho que no se han observado variaciones de reproducibilidad en los tiempos de migración en el análisis de proteínas de suero de leche cruda y leche UHT cuando la separación se realiza en capilares recubiertos (Cifuentes, 1993). Además se sabe que existen numerosos cambios en las proteínas durante el calentamiento (Walstra, 1984), y algunos de estos cambios pueden afectar a la estructura y concentración de las proteínas bovinas de suero de forma que la adsorción sobre la pared del capilar sea distinta para leches sometidas a diferentes tratamientos térmicos.

• Preparación de la muestra

Otro parámetro a seleccionar antes de proceder al análisis de muestras reales es el método de preparación de la muestra. El suero lácteo se obtiene por precipitación de las caseínas a pH 4.6, bien con HCl o con tampón acético-acetato. Este factor tiene una marcada influencia sobre la resolución, observándose que con acetato se obtienen bandas más anchas (**Figura 23a**), y siendo recomendable, por tanto el empleo de ácido clorhídrico (**Figura 23b**) que, probablemente debido a un efecto de isotacoforesis, permite obtener mucha mayor resolución.

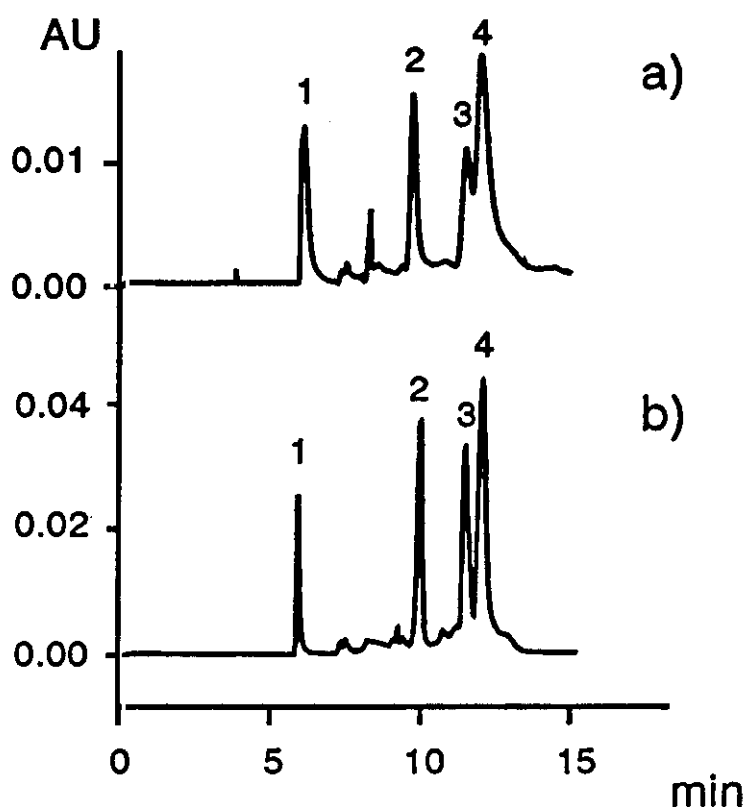


Figura 23. Electroforegramas de sueros bovinos preparados por precipitación de las caseínas a pH 4.6 con a) tampón acético-acetato, b) HCl. Separación a 7 Kv en capilar sin recubrir (75 μ m de I.D.; l=30 cm; L=37cm). Tampón bórico-borato 100 mM; Na₂SO₄ 30 mM; pH 8.2. Inyección por presión de nitrógeno (0.5 psi) durante 2s. T^a=25°C. Detección a 214 nm. Identificación de picos: 1) Patrón interno (Lys-Trp- Lys); 2) α -LA, 3) β -LG B, 4) β -LG A.

• Estudio de posibles interferencias con otras proteínas lácteas

Además de las proteínas principales del suero, hay otras seroproteínas como inmunoglobulinas (Ig) y lactoferrina (LF) que pueden estar presentes en el suero. Para la puesta a punto del método, tanto desde el punto de vista cualitativo, como cuantitativo, se han estudiado las posibles interferencias de estas proteínas de lactosuero (**Figura 24**). La mayor concentración de IgG en leche es

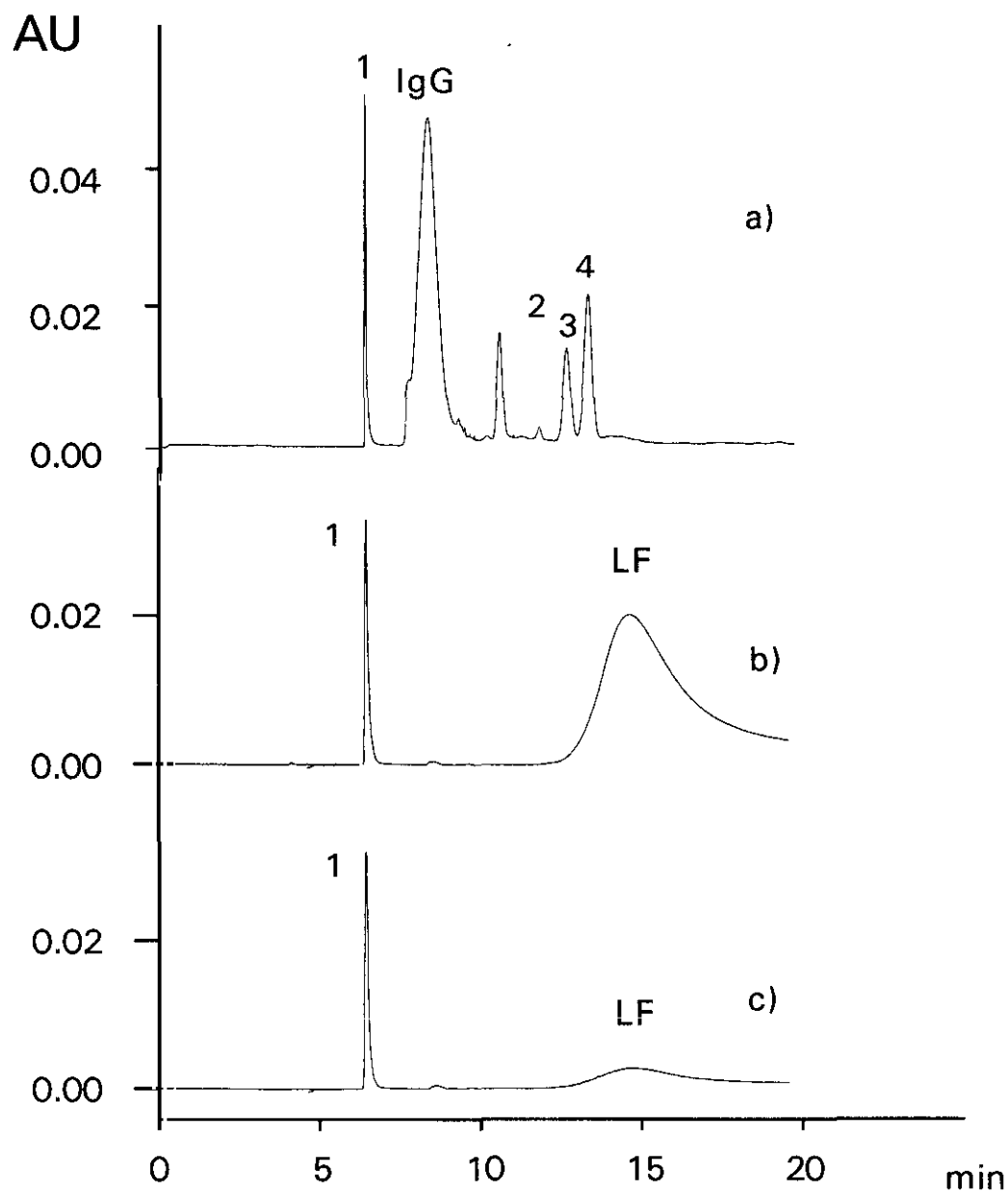


Figura 24: Electroforegramas de a) mezcla 1:1 de suero bovino e IgG bovina (10 mg/ml), b) LF bovina (10 mg/ml) y c) LF bovina (8.9 mg/ml). Condiciones de separación iguales a las descritas en la figura 23. Identificación de picos; 1: PI Lys-Trp-Lys; 2: α -LA; 3: β -LG B; 4: β -LG A.

de 0.7 mg/ml (Larson, 1992). En **Figura 24a** se muestra un suero lácteo al que se le ha adicionado IgG bovina (10 mg/ml) en proporción 1:1. Se puede observar que la IgG no interfiere con α -LA, β -LG B, ni β -LG A. Por otra parte, si existiera una gran concentración de LF, su pico podría solapar parcialmente con el de β -LG A. Sin embargo, la concentración de LF en leche cruda de vaca es menor de 0.2 mg/mL (Sánchez, 1992) y el pico de LF sólo es detectable, en las condiciones presentadas, en concentraciones del orden de 8 mg/mL. La **Figura 24b**) muestra una concentración de LF de 10 mg/mL, y la **Figura 24c**) 8.9 mg/mL de LF, mientras que concentraciones menores no permiten observar la proteína, hecho que puede ser debido al fenómeno de adsorción no específica sobre la pared del capilar mencionada anteriormente, debido a su pl, cercano a 8. Al pH del tampón de separación, pH 8.2, habría una elevada proporción de LF con carga positiva neta, que favorecería las interacciones con los grupos silanoles cargados negativamente.

• Cuantificación.

Para poder utilizar el método con fines cuantitativos, estudiamos la relación existente entre el área de pico medido a 214 nm y la concentración de cada proteína para una mezcla de estándares de las proteínas de suero lácteo. Tanto para las mezclas de estándares como para las muestras, la inyección se realizó por presión para evitar la influencia de la matriz de la muestra sobre la cantidad inyectada, influencia que tiene lugar cuando la inyección se realiza por *electromigración*. Para compensar las posibles variaciones debidas al volumen de inyección, las áreas se calcularon como valores relativos al área de pico del patrón interno, el péptido Lys-Trp-Lys. Para realizar el ajuste, al igual que para cuantificar las muestras, empleamos los valores de área corregida, que tienen en cuenta que en *electroforesis capilar* el área de pico depende de la velocidad a la que migra la muestra a través de la ventana de detección.

Encontramos que para cada una de las proteínas la relación entre la concentración y el área relativa corregida se ajusta a una recta (**Tabla 16**).

Tabla 16: Curvas de calibrado del área relativa corregida frente a la concentración de proteínas de suero estándar en una mezcla de patrones.

PROTEÍNA	RANGO DE CONCENTRACIÓN (mg/100 ml)	PENDIENTE	ORDENADA EN EL ORIGEN	s	CV
α -LA	4.6-128	1.84×10^{-2} (9.96×10^{-4}) ^a	-0.0815 (0.0380) ^b	0.0795	1.77
β -Lg A	16-256	1.78×10^{-2} (8.90×10^{-4}) ^a	-0.2260 (0.1177) ^b	0.2458	1.63
β -Lg B	19.5-312	1.57×10^{-2} (7.57×10^{-4}) ^a	-0.3578 (0.0041) ^b	0.2548	1.65

^a: Error estándar para la pendiente; ^b: Error estándar de la ordenada en el origen; s: Desviación estándar residual; CV: Coeficiente de variación.

Contenido en β -LG A y B y α -LA de leche de vaca de diferentes razas por electroforesis capilar.

El método de electroforesis capilar para las proteínas de suero, realizado en capilares sin recubrir, se aplicó para la determinación del contenido en β -LG A y B y α -LA en leches individuales de vacas de las razas Holstein, Fleckvieh y Menorquina.

Los datos existentes en la bibliografía para diferentes razas indican una influencia del genotipo de β -LG sobre el contenido total de esta proteína en la leche (Jakob, 1994). Puesto que las β -LG, seguidas por la α -LA son los componentes mayoritarios del suero lácteo, su concentración influye decisivamente sobre el contenido proteico del lactosuero.

Las relaciones lineales obtenidas entre las áreas relativas de picos corregidos y la concentración de las proteínas de suero individuales mediante mezclas de proteínas estándar, se emplearon para determinar el contenido en proteína de

12 muestras de leche de cada una de las razas Holstein y Fleckvieh, que presentan genotipos de β -LG AA, BB y AB (**Figura 25**) y en 12 muestras de la raza Menorquina, para las que no se observó el genotipo BB.

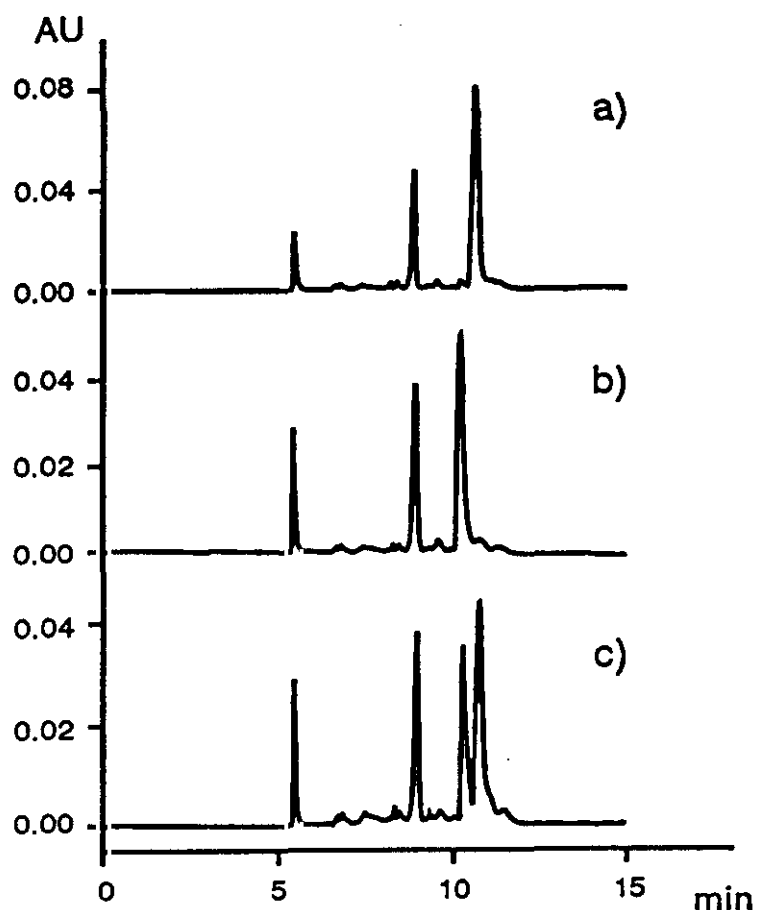


Figura 25: Electroforegramas de sueros de leche de vaca de la raza Fleckvieh, con diferentes genotipos para la β -LG: a) β -LG AA, b) β -LG BB y c) β -LG AB. Condiciones de separación iguales a las descritas en la figura 23. Identificación de picos; 1: PI Lys-Trp-Lys; 2: α -LA; 3: β -LG B; 4: β -LG A.

De este modo, y analizando cada muestra por duplicado, se observó (**Tabla 17**) que existen, como es sabido, grandes diferencias entre individuos incluso de una misma raza y con un mismo genotipo, para cada una de las tres razas estudiadas.

Tabla 17. Concentración de las proteínas de suero principales en leche de 3 razas bovinas frente al genotipo de β -LG.

Raza	Genotipo β -Lg	Concentración (mg/100 ml)		
		α -LA	β -LG	$\Sigma(\alpha$ -LA + β LG)
Fleckvieh	AA n=4	100.00 (17.36)*	336.12 (17.77)	436.12 (15.28)
	BB n=4	121.50 (14.23)	254.81 (6.79)	376.21 (8.29)
	AB n=4	99.08 (7.82)	322.89 (7.05)	422.03 (7.17)
Holstein	AA n=4	85.89 (1.23)	276.79 (6.27)	362.67 (4.49)
	BB n=4	80.82 (13.1)	154.88 (9.70)	235.70 (10.26)
	AB n=4	75.54 (5.72)	248.92 (15.61)	324.45 (13.10)
Menorquina	AA n=4	98.06 (11.79)	319.70 (11.78)	417.76 (11.47)
	BB n=4	91.29 (13.41)	311.93 (12.36)	403.20 (12.16)

* Los números entre paréntesis indican

El mayor contenido total de β -LG corresponde a las muestras con genotipo AA de esta proteína, estando asociado el menor contenido en β -LG total con el genotipo BB en aquellas razas en que éste se ha encontrado, y siendo, lógicamente, intermedio el contenido para la población de individuos heterocigóticos (**Figura 26a**). Para un mismo genotipo, podemos observar que

las muestras de leche de la raza Holstein presentan una concentración de β -LG total inferior a la de las otras dos razas.

El genotipo de una proteína puede estar relacionado con la cantidad producida de otra proteína. Uno de los ejemplos mejor conocidos es el mayor contenido en caseínas existente en leches con genotipos β -LG BB en relación a otros genotipos de esta proteína (Jakob, 1994). Al estudiar el efecto del genotipo de β -LG sobre el contenido en α -LA (**Tabla 17**) del suero lácteo observamos que al contrario de lo que ocurría para el contenido en β -LG total, el contenido de α -LA no depende del genotipo de β -LG (**Figura 26b**), obteniéndose para la raza Fleckvieh una mayor concentración de α -LA asociada con el genotipo BB de β -LG, al contrario que para las muestras de Holstein, donde las diferencias entre genotipos no son significativas, y en todo caso la media del contenido en α -LA, es mayor en la población de genotipo AA.

Por otro lado, las poblaciones de muestras homocigóticas de β -LG AA presentaron un mayor contenido en proteínas mayoritarias de suero, incluyendo como tales α -LA, β -LG B y β -LG A, que las poblaciones heterocigóticas AB, y éstas que las homocigóticas BB, siendo máxima la diferencia para la raza Holstein, y mostrándose un menor efecto para las otras dos razas. En la tabla se muestra también que la raza Holstein es la más pobre en proteínas de suero lácteo.

Los elevados coeficientes de variación obtenidos para el contenido de proteína en leche de vaca para un genotipo y una raza dados y el menor contenido en proteína en general, observado para la raza Holstein, pueden ser debidos a otros factores que no sea la influencia del genotipo de β -LG, como pueden ser la estación del año, el estado nutricional, la edad, el estado de salud, etc. (Ng Kwai Hang y col, 1987)

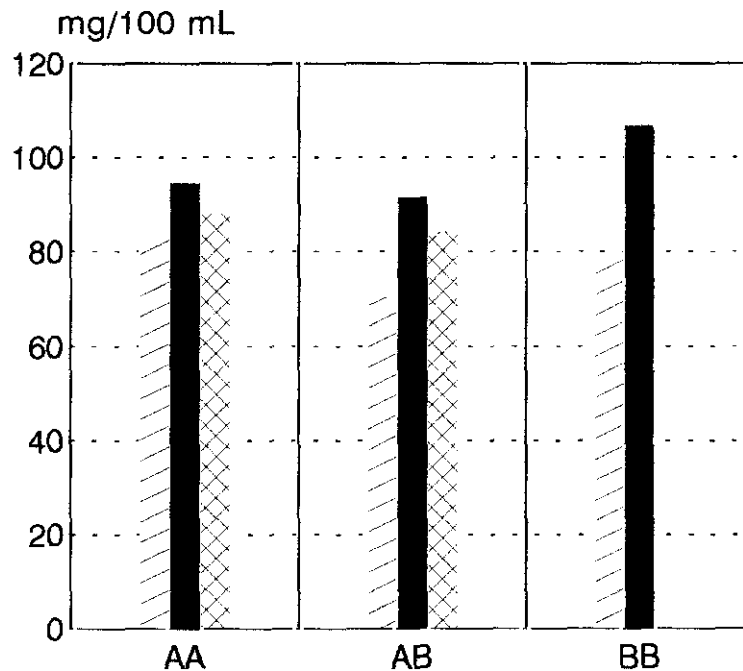
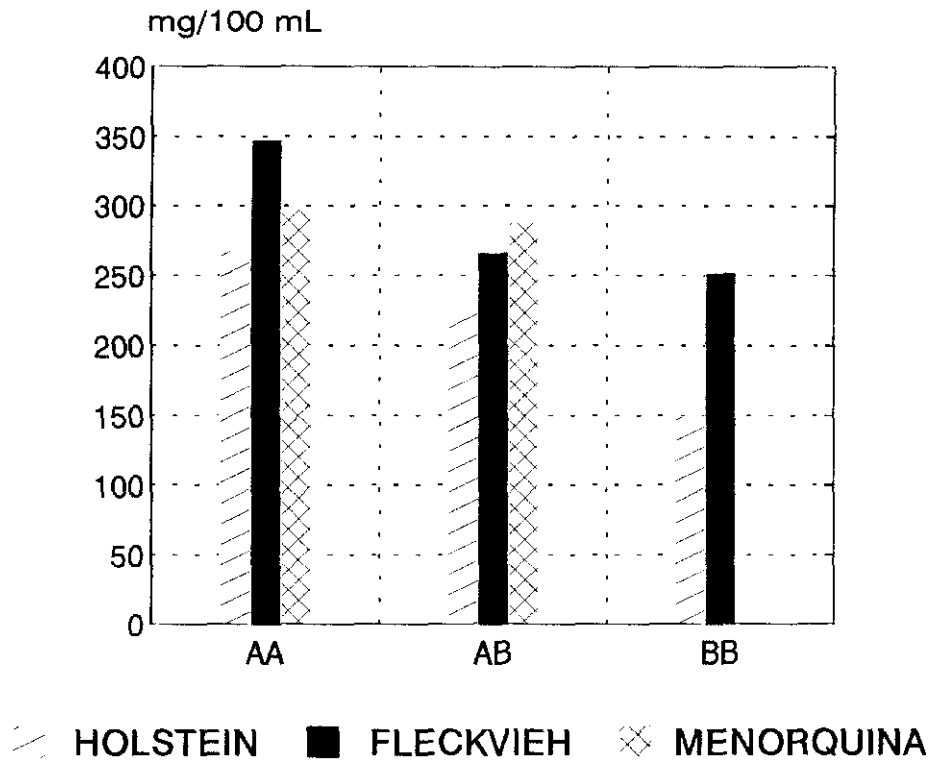


Figura 26: Contenido total en β -LG a) y en α -LA b) para los diferentes genotipos de β -LG de la leche de vaca de las razas Holstein, Fleckvieh y Menorquina.

Como se ha visto la concentración de β -LG en la leche de las diferentes razas puede estar relacionada con el genotipo de β -LG. Esto parece indicar que en las glándulas mamarias bovinas hay una mayor expresión del alelo β -LG A que del alelo β -LG B. Para comprobar esta hipótesis se ha determinado qué proporción de β -LG en el suero lácteo era debida a cada uno de los alelos A y B en vacas heterocigotas. El diagrama de barras de la **Figura 27** corrobora claramente la hipótesis, al poner de manifiesto que tanto para la raza Holstein, como para la Fleckvieh y la Menorquina, el alelo A produce un mayor porcentaje de la β -LG total existente en la leche de vacas heterocigóticas AB, habiéndose encontrado diferencias significativas ($p < 0.05$) para las cantidades de β -LG producida por cada alelo.

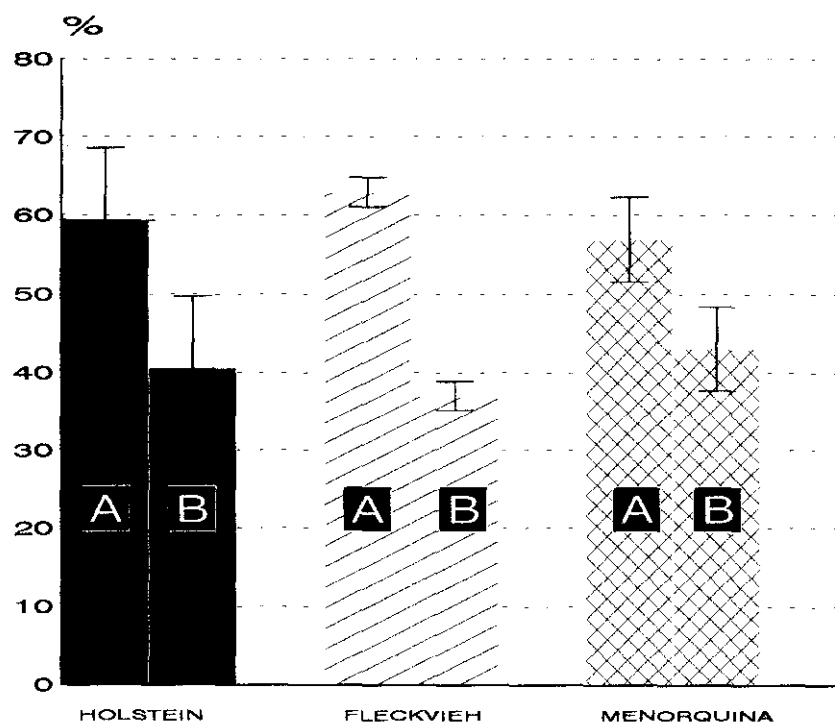


Figura 27: Porcentaje de β -LG A y B en la leche de vaca de las razas Fleckvieh, Holstein y Menorquina con genotipo AB para la β -LG

Otros autores han obtenido resultados similares, si bien aún existe cierta controversia sobre el tema (Jakob, 1994). No está claro a qué es debida la mayor velocidad de biosíntesis de una variante genética que de otra de una misma proteína. Se sabe que mientras que los cambios en la estructura de la proteína sólo pueden ser debidos a mutaciones producidas en los exones codificantes, los efectos sobre la cantidad de proteína sintetizada pueden estar producidos por mutaciones en cualquier área del gen (Grosclaude y col, 1995). El efecto observado acerca de la cantidad de β -LG producida debe ser un efecto directo del gen, puesto que la tendencia observada es la misma para todas las razas.

Estudio de los perfiles electroforéticos de leche de oveja, vaca y cabra

La fracción seroproteica de las diferentes especies analizadas por CE muestran perfiles electroforéticos característicos (**Figura 28**), como se había comprobado por las técnicas electroforéticas convencionales. En la figura existe una notable diferencia en las unidades de absorbancia en los ejes de ordenadas para cada especie debido al diferente contenido en seroproteínas que posee cada una de ellas. Como se muestra en la figura (**Fig 28a**) el método permite la separación de las variantes genéticas de la β -LG de vaca. Las seroproteínas de oveja y de cabra se comportan de diferente forma que las de vaca. Este método, desarrollado para proteínas de suero bovinas proporciona peor reproducibilidad de los tiempos de migración, cuando se aplica a otras especies. Este hecho puede ser atribuido a la diferente naturaleza de la matriz y a las diferencias de la secuencia aminoacídica en las distintas proteínas de cada especie. Algunos de estos residuos podrían contribuir a que la proteína quedase absorbida sobre la pared del capilar, disminuyendo el flujo electroosmótico. La migración más lenta, habitualmente va acompañada por una pérdida de resolución, siendo incluso posible observar las dos variantes genéticas de la β -LG de oveja. Sin embargo, en este caso, los tiempos de análisis se hacen demasiado largos para aplicaciones prácticas y la reproducibilidad es baja.

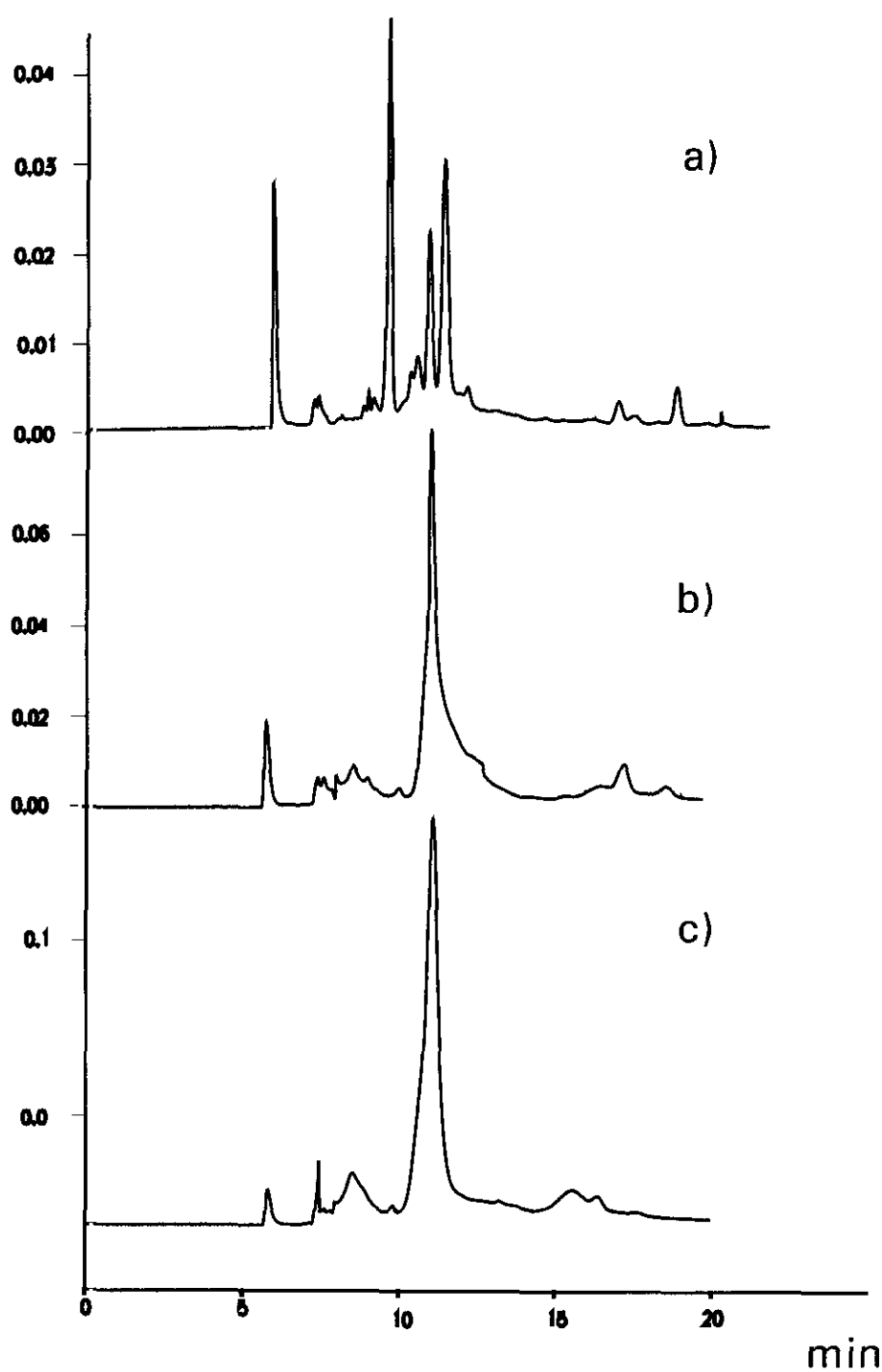


Figura 28: Electroforegramas de sueros de leche de a) vaca, b) oveja y c) cabra. condiciones de separación iguales a las descritas en la figura 23.

3.3. FRACCIONAMIENTO Y ESTUDIO DE LA FRACCIÓN PEPTÍDICA EN QUESOS DE OVEJA, VACA Y CABRA

El extracto hidrosoluble, que contiene los elementos de bajo peso molecular, en los quesos estudiados, es una fracción rica en péptidos y aminoácidos. Estos últimos parecen ser los componentes más influyentes en el sabor y sus efectos sinérgicos, normalmente, con las sales minerales pueden tener un gran efecto (Tamura y col., 1989). El análisis de esta fracción aporta información sobre la influencia de la composición del queso en las peculiaridades de su aroma y sabor.

3.3.1. PÉPTIDOS DE PESO MOLECULAR INFERIOR A 10 000 D.

El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC) y electroforesis capilar (CE) de la fracción de nitrógeno soluble en agua (WSNF) de los quesos fabricados con leche pura de oveja, vaca y cabra dieron como resultado perfiles peptídicos muy complejos (resultados no mostrados) por lo que se procedió a su fraccionamiento para facilitar el estudio.

Fraccionamiento por peso molecular e hidrofobicidad

Para simplificar el análisis y, puesto que la fracción soluble en agua del queso consiste en una mezcla heterogénea de péptidos, aminoácidos y proteínas de suero, los péptidos y las proteínas de elevado peso molecular se separaron utilizando Centricon® con una membrana de tamaño de corte de 10 000 D de peso molecular, obteniendo así la fracción de nitrógeno soluble en agua de quesos (WSNF), de peso molecular menor de 10 000 D. La **Figura 29** muestra la separación por RP-HPLC y CE de aminoácidos y péptidos presentes en esta fracción para quesos de leche de vaca.

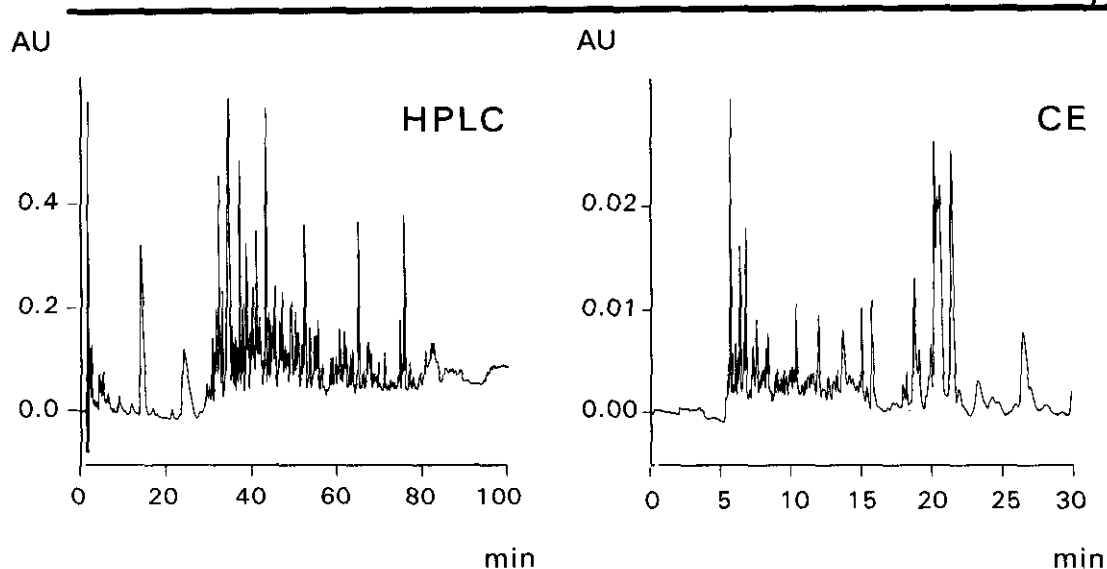


Figura 29: Análisis de la fracción de nitrógeno soluble en agua de peso molecular inferior a 10 000 D (WSNF < 10 000 D) de un queso de leche de vaca por HPLC y CE. (Detección a 214 nm).

Comparando estas técnicas se observa que ambos métodos proporcionan separaciones eficaces. El estudio de la reproducibilidad del tiempo de análisis demostró que los coeficientes de variación de la CE eran superiores a los obtenidos por RP-HPLC, y que la sensibilidad, calculada como la señal / 3 veces el ruido era tres veces mejor con HPLC; sin embargo, la separación mediante CE fue mucho más rápida (30 min.) que por RP-HPLC (90 min.). Estos resultados concuerdan en cuanto a reproducibilidad, sensibilidad y rapidez con anteriores estudios sobre la aplicación de CE y HPLC para la separación y cuantificación de péptidos y proteínas lácteas (Colburn, 1992; Cifuentes y col., 1993).

Las separaciones por CE se llevaron a cabo con capilares recubiertos para minimizar la adsorción de los péptidos a la pared del capilar. Se seleccionó un tampón de separación con un pH de 2.5, puesto que en estas condiciones los péptidos quedan cargados positivamente y, consecuentemente, todos migran en dirección al cátodo. Hay que tener en cuenta que en capilares recubiertos el flujo electroosmótico es prácticamente nulo.

Aunque el fabricante advierte que valores de pHs muy ácidos podrían afectar al recubrimiento del capilar, se hicieron aproximadamente 200 inyecciones y sólo, en la parte final del electroforegrama se observaron ligeras variaciones en los tiempos de migración y pequeñas pérdidas en la eficacia de separación,

Los perfiles de RP-HPLC y CE del WSNF < 10 000 D seguían siendo complejos, si bien ya mostraban algunas diferencias según el origen de la leche (vaca, cabra y oveja). Únicamente los aminoácidos aromáticos Tyr, Phe y Trp, y los picos mayoritarios estaban presentes en todos los casos. Para conseguir una interpretación más sencilla de estos perfiles se realizó un fraccionamiento del WSNF < 10 000 D para los diferentes quesos usando cartuchos Sep Pak C18.

Cada una de las seis fracciones eluidas del Sep Pak C18 con diferentes porcentajes de acetonitrilo (AcN) fueron analizadas mediante CE. En comparación a la WSNF < 10 000 D total, los electroforegramas presentaron peor resolución y variaciones en el tiempo de migración (**Figura 30a**). Se observó que este efecto era más acusado cuanto mayor era la proporción de AcN en la elución del Sep-Pak, por lo que se pensó que estos resultados estaban causados probablemente por la presencia de diversos iones y AcN en la matriz de la muestra. Para averiguar si el AcN o los iones presentes eran los responsables de este comportamiento anómalo, antes de realizar la separación por CE se eliminó por liofilización el eluyente orgánico y el residuo fue reconstituido con agua. Eliminado el AcN, la resolución y la calidad de la línea base mejoraron notablemente (**Figura 30b**).

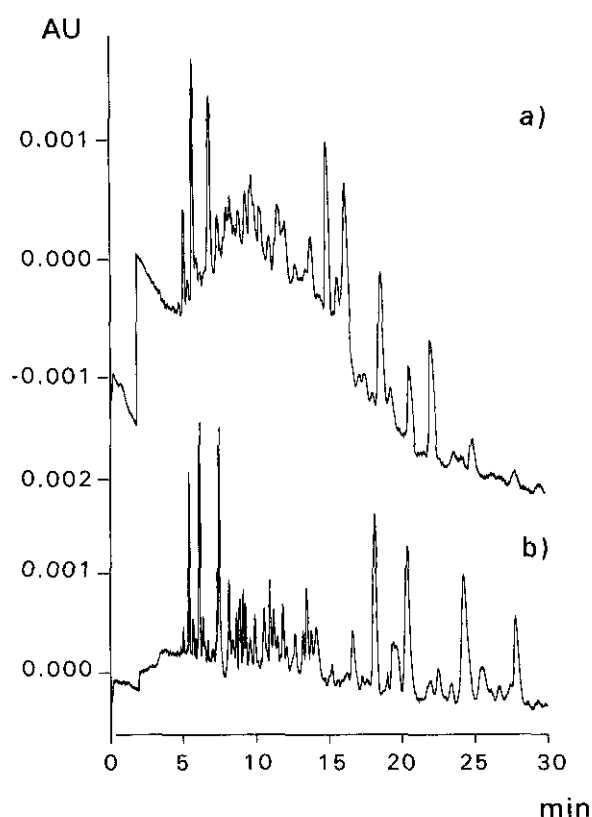


Figura 30: Electroforegramas de la fracción de nitrógeno soluble en agua de peso molecular <10 000 D, eluido de un cartucho Sep-Pak con 30 % de acetonitrilo (con 0.1% de TFA) de un queso de vaca (a), y la misma fracción reconstituida en agua después de eliminación del acetonitrilo por liofilización (b). (Detección a 214 nm).

De igual modo eliminado el AcN de la matriz de las muestras, se obtuvieron de nuevo tiempos de migración reproducibles. Probablemente, el AcN disminuye la conductividad y la constante dieléctrica de la muestra con lo que la carga de los péptidos se modifica durante la separación y esto acarrea los efectos no deseados. Otros autores han identificado fenómenos parecidos, indicando que la presencia de un modificador orgánico en la disolución de la muestra puede afectar al comportamiento migracional de los analitos (Crabtree, 1994)

Análisis mediante cromatografía de líquidos y electroforesis capilar de las diferentes fracciones obtenidas

Para los tres tipos de queso (de vaca, de oveja y de cabra) tanto en la fracción no retenida como en la fracción eluida con TFA al 0.1% en agua no se observaron picos. Las otras cuatro fracciones eluidas con 0.1% TFA en 10, 20, 30 y 100% de AcN en agua con 0.1% TFA, se muestran en las **Figuras 31, 32 y 33**. Comparando los perfiles cromatográficos y electroforéticos de las fracciones Sep-Pak C18, junto con el examen de la absorbancia a 214 y 280 nm de los componentes principales, se consiguieron identificar algunos picos de CE. El análisis paralelo mediante ambas técnicas señala que los componentes separados en Sep-Pak C18, en base a su diferente hidrofobicidad, presentan lógicamente polaridades similares en el caso de RP-HPLC, mientras que sus movilidades electroforéticas varían mucho, lo que quiere decir que los péptidos de hidrofobicidad parecida son completamente diferentes entre sí en cuanto a la relación carga/masa.

Las fracciones eluidas con AcN al 10, 20, 30 y 100% (AcN siempre con 0.1% TFA) tienen los mismos picos mayoritarios en los tres tipos de queso (**Figuras 31, 32 y 33**) pero cada tipo de queso presenta un perfil peptídico característico. Los picos mayoritarios que se obtuvieron de las fracciones eluidas a partir de cartuchos Sep-Pak C18 con 10% de acetonitrilo correspondían a los aminoácidos Tyr y Phe y un péptido hidrofílico que no presentaba absorbancia a 280 nm (señalado como 1 en las **Figuras 31, 32 y 33**). Este pico, presenta una absorbancia a 214 nm dos veces menor en el queso de leche de oveja que en los quesos de leche de vaca y cabra.

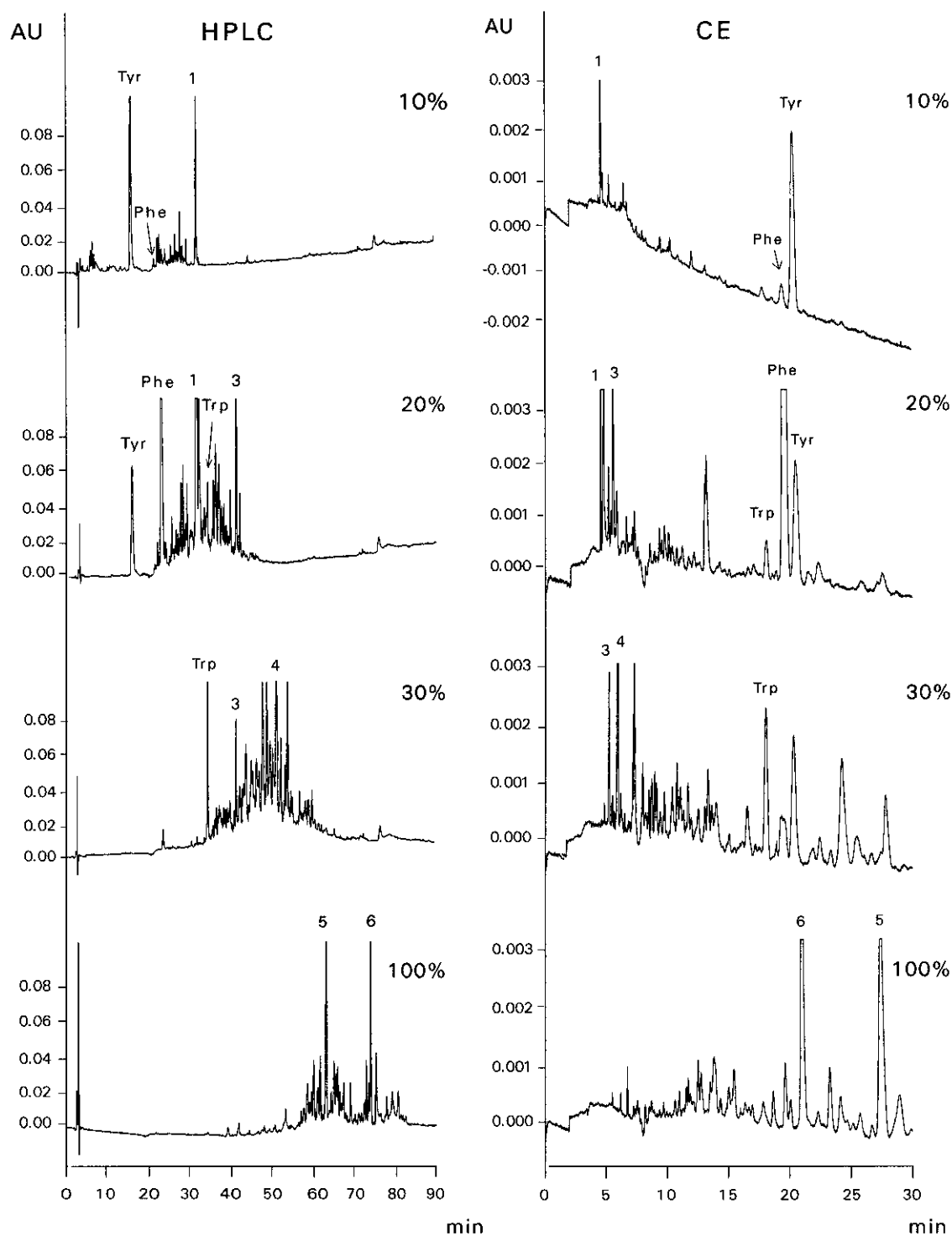


Figura 31: Análisis de las fracciones de nitrógeno soluble < 10 000 D de un queso de leche de vaca, eluidas con 10, 20 30 y 100% de acetonitrilo en agua (con 0.1% de TFA) por HPLC y CE. (Detección a 214 nm).

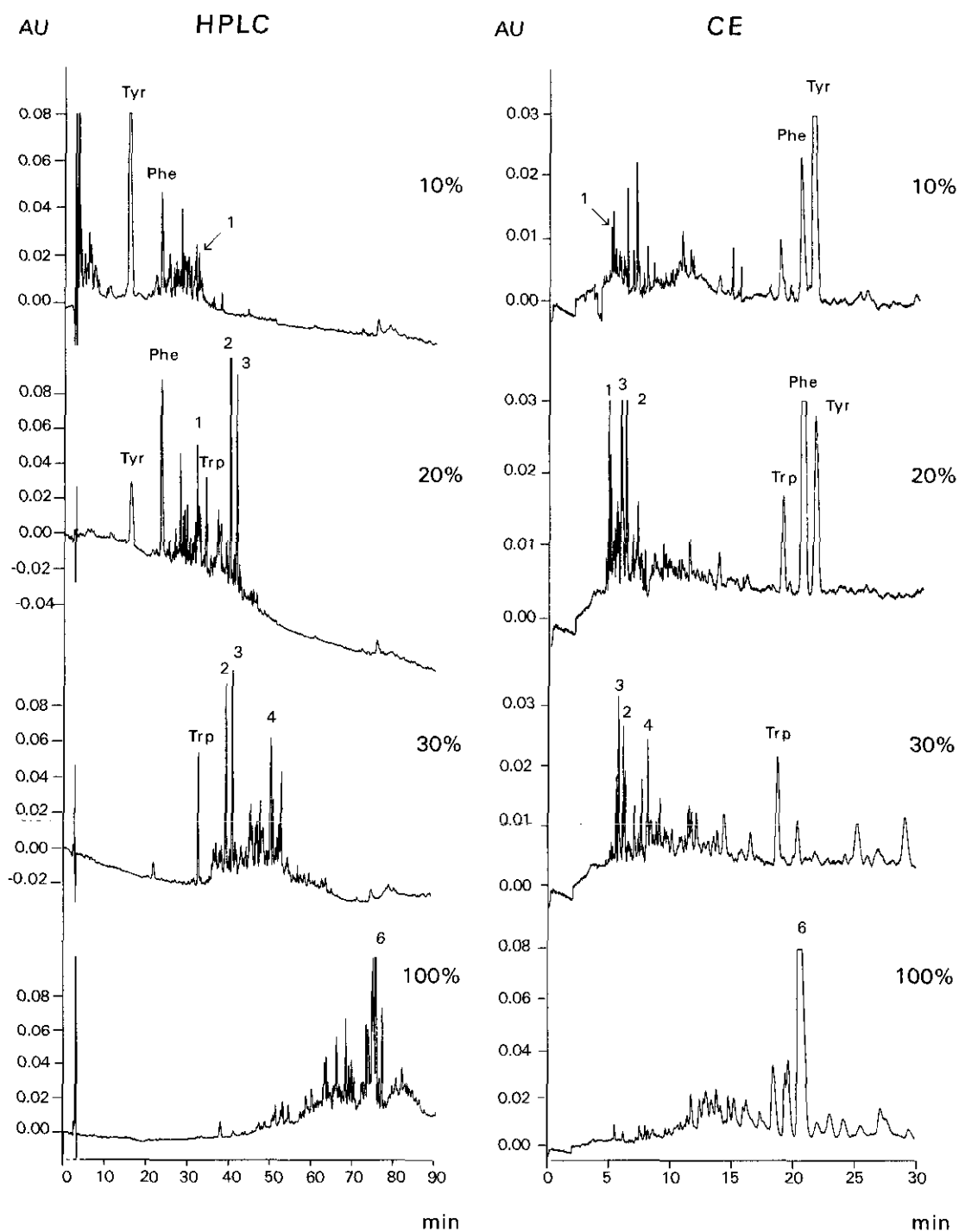
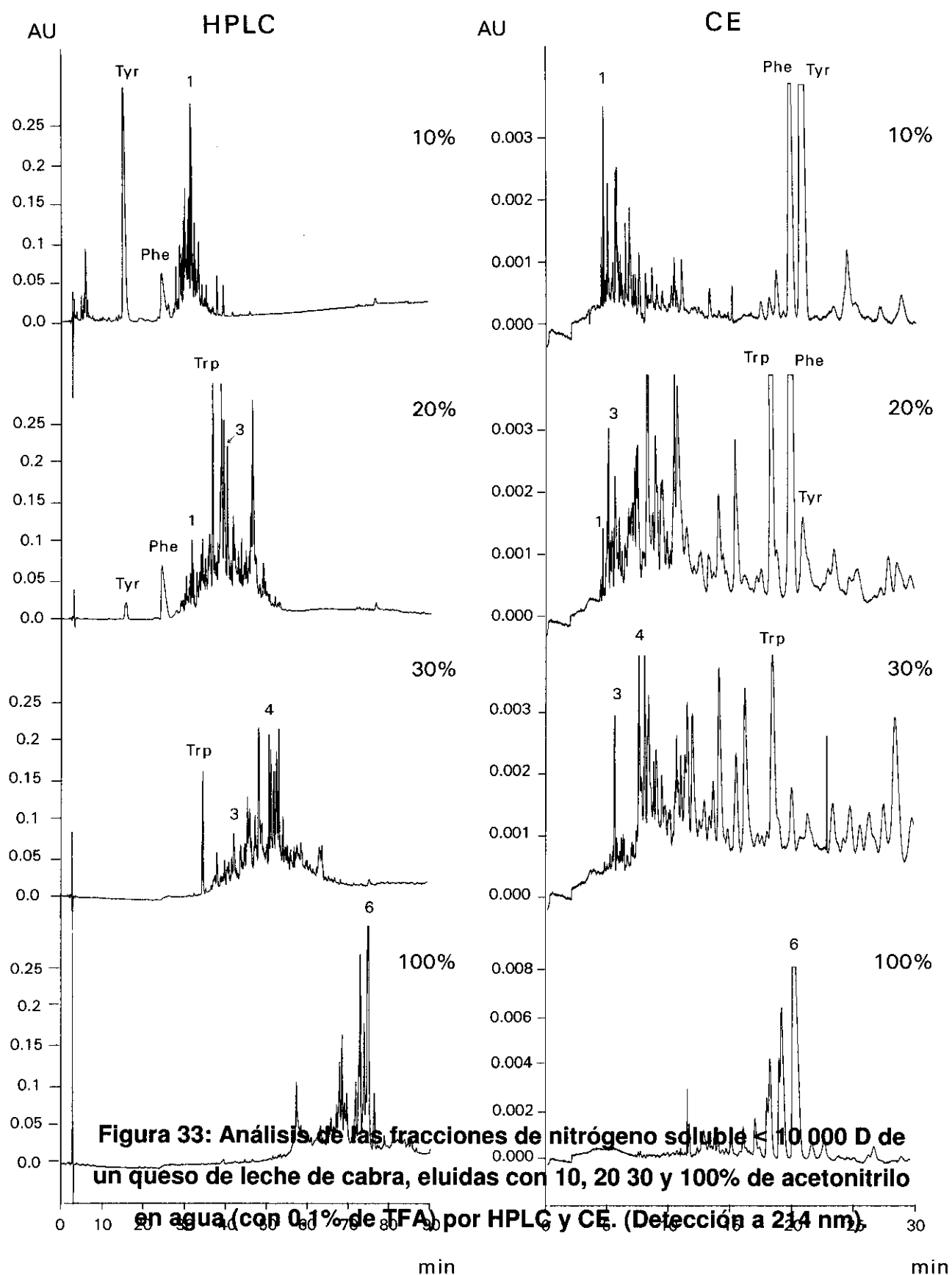


Figura 32: Análisis de las fracciones de nitrógeno soluble < 10 000 D de un queso de leche de oveja, eluidas con 10, 20 30 y 100% de acetonitrilo en agua (con 0.1% de TFA) por HPLC y CE. (Detección a 214 nm).



En la elución con 20% de AcN aparecieron tres nuevos picos, junto a los anteriormente citados. El primero en la secuencia de elución de RP-HPLC fue identificado como Trp (por comparación con el tiempo de retención del patrón y con el cromatograma obtenido a 280 nm). El segundo pico propio de esta fracción, sólo se encontró como mayoritario en el queso de leche de oveja (2 en la **Figura 32**), no pudiendo comprobar su ausencia o presencia en los quesos de leche de vaca y cabra, pues no absorbía a 280 nm. El último de ellos (3 en las **Figuras 31, 32 y 33**) estaba presente en los quesos de leche de las tres especies. Las fracciones eluidas con acetonitrilo al 30% tenían unos tiempos de retención en RP-HPLC entre 34 y 60 minutos, pero eran las que más heterogeneidad presentaban en CE. En esta fracción uno de los picos principales presentaba absorbancia a 280 nm (4 en las **Figuras 31, 32 y 33**). Por último, las fracciones unidas más tenazmente al cartucho, eluidas con acetonitrilo al 100%, mostraron dos picos principales para el queso de leche de vaca (5 y 6 en la **Figura 31**) y uno en el caso de quesos de leche de cabra y oveja (6 en las **Figuras 32 y 33**). En los tres tipos de queso aparecía este pico (6) con absorbancia a 280 nm que presentaba, bajo estas condiciones experimentales, una movilidad electroforética muy similar a la de la Phe. En general, los perfiles electroforéticos muestran que las fracciones de queso de leche de cabra son más complejas, excepto para la fracción que eluye con 100% de AcN, presentando mayor cantidad de péptidos que las fracciones de los quesos de leche de vaca y oveja.

El cálculo de los tiempos de retención de RP-HPLC frente a los tiempos de migración de CE permite mostrar el carácter complementario de estas dos técnicas puesto de manifiesto por el escaso coeficiente de correlación de la curva de regresión ($r = 0.0128$). Este aspecto ya ha sido comentado por otros autores (Grossman y col., 1989; Cobb y Novotny, 1989) y podría representar un índice de calidad sobre la combinación de CE y RP-HPLC aplicada a la caracterización de alimentos (Moore y col., 1996).

3.3.2. Análisis de fracciones peptídicas de peso molecular inferior a 1 000 D.

■ Fraccionamiento por cromatografía de gel permeación (GPC)

Existen numerosos solventes en la bibliografía para la extracción de compuestos nitrogenados del queso de bajo peso molecular: soluciones de ácido fosfotúngstico (Reiter y col, 1969), ácido tricloroacético y etanol (Reville y Fox, 1978) y mezclas metanólicas (Lluemieux y al., 1989). Kuchroo y Fox, 1982, han comparado varias técnicas de homogeneización y parámetros como temperatura, duración de la homogeneización, relación queso/agua y el empleo de varios reactivos para la precipitación selectiva para optimizar la separación. Bican y Spahni (1991), mostraron que una extracción ácida con un solvente que contenga 1% de NaCl, 1% de TFA, 5% de ácido fórmico y 1N HCl, es la aproximación más prometedora para el aislamiento de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular. Sin embargo, ninguno de estos métodos descritos en la bibliografía, permitía el análisis sensorial de las distintas fracciones, por lo que para este tipo de estudios la obtención de WSNF < 1000 D con agua es el método más apropiado. La fracción soluble en agua es muy compleja y su fraccionamiento por cromatografía es necesario para medir la importancia organoléptica de cada uno de los constituyentes del gusto, en particular aminoácidos y péptidos, si bien la forma óptima de abordar el estudio, sería la de introducir las fracciones purificadas en un queso-base, determinar la secuencia de los péptidos aislados por espectrometría de masas e identificar los componentes volátiles de la fracción soluble en agua (Salles y col., 1995).

Los métodos que como la GPC, se basan en la separación por tamaño molecular, han sido frecuentemente empleados para el aislamiento de fracciones peptídicas de distintos alimentos. Aston y Creamer (1986) fraccionaron el WSNF del queso Cheddar con Sephadex G-15, Lemieux y col. (1989), aislaron fracciones astringentes y amargas también de queso Cheddar con un gel TSK-G 2000 SW, Dale y Young (1989) separaron compuestos de

bajo peso molecular en cerveza con Sephadex LH-20 , mientras que González de Llano y col. (1991) separaron compuestos nitrogenados en Sephadex G-10. El principal interés de la GPC es la posibilidad que ofrece para la elución con agua.

La fracción total de nitrógeno soluble en agua fue ultrafiltrada, antes de su fraccionamiento por GPC, obteniendo así el WSNF < 1 000 D, para eliminar los péptidos de mayor tamaño, que además son los que están más relacionados con el sabor amargo, y por tanto una de las causas de rechazo de los alimentos (Lemieux y Simard, 1992). La mayoría de las caseínas y péptidos de alto peso molecular podrían ser eliminados por precipitación a pH 4.6, sin embargo es preferible la ultrafiltración para no introducir en las muestras ningún compuesto en las muestras que no sea agua.

El perfil cromatográfico obtenido del WSNF <1 000 D de un queso Manchego comercial, se muestra en la **Figura 34**, donde se pueden observar las 7 fracciones recogidas.

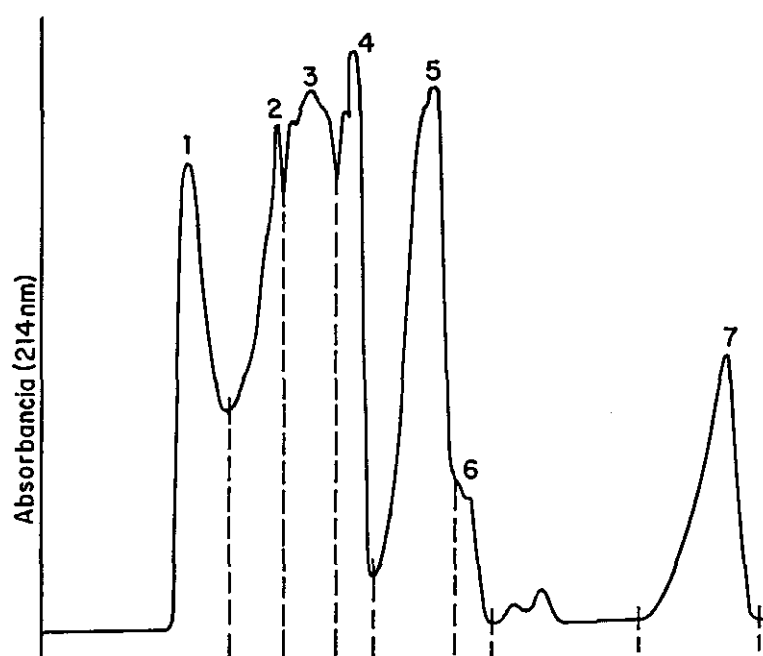


Figura 34: Cromatograma de GPC de la WNSF < 1 000 D de un queso Manchego.

■ **Análisis de las fracciones obtenidas por cromatografía de gel permeación**

En alícuotas de estas 7 fracciones recogidas se determinó la concentración de iones y aminoácidos, se obtuvo el perfil peptídico y se relacionó con los resultados obtenidos por análisis sensorial.

En la **Figura 35** se muestra la concentración en g/kg de queso de Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , fósforo inorgánico y Cl^- , donde se observa que el mayor contenido total en iones, lo presentan las fracciones 4 y 3 seguidas por la 2 y la 1. Esto explica que los picos 2-4 no pudiesen ser mejor resueltos, porque corresponden a las fracciones que contienen la mayor parte de los iones (Salles y col., 1995). En la fracción 5 sólo se encontró Ca^{2+} y Cl^- y en las fracciones 6 y 7 exclusivamente Cl^- , siendo su concentración en las tres fracciones no significativa.

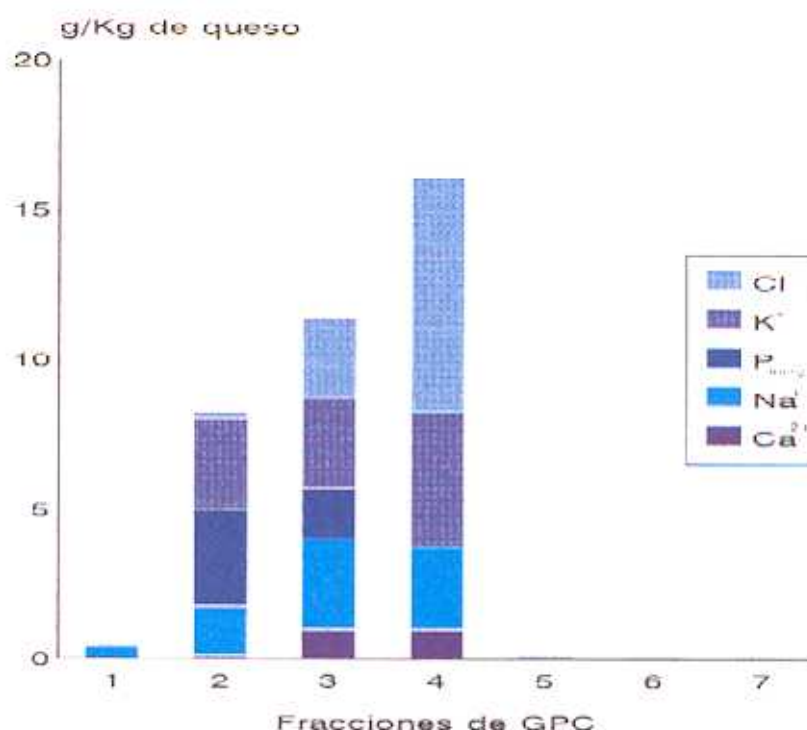


Figura 35: Suma de las concentraciones (g/Kg de queso) de Ca²⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻ y fósforo inorgánico en las 7 fracciones recogidas.

El contenido en iones es importante pues el gusto de una fracción puede resultar del efecto sinérgico de varios componentes, normalmente interacciones de los iones con aminoácidos y con péptidos de bajo peso molecular. Es evidente que compuestos como el NaCl, aun en concentraciones no muy elevadas, influyen en el desarrollo del sabor y la textura que se desarrolla durante la maduración (Aston y Creamer, 1986). Este es uno de los problemas que presenta el análisis de estas fracciones por cromatografía, la pérdida de sabor debido a la separación de componentes con efectos sinérgicos. Por ejemplo, Biede y Hammond (1979) comprobaron mediante análisis sensorial que la cromatografía de intercambio iónico alteraba sustancialmente las propiedades organolépticas de las diferentes fracciones, debido fundamentalmente a la eliminación del Ca²⁺ y Mg²⁺.

Debido a la influencia del contenido en aminoácidos sobre el aroma y sabor del queso, se realizó la determinación de aminoácidos libres en las 7 fracciones (Tabla 18).

Tabla 18. Composición en aminoácidos libres (mg/l) de las fracciones recogidas de GPC.

	FR. 1	FR. 2	FR. 3	FR. 4	FR. 5	FR. 6	FR. 7
Asp	244.77	3618.60	72.04				
Glu	880.05	12161.40	124.47				
Asn			2240.15				
Ser			114.18				
Gln			1023.31				
Glv			646.72				
Thr			538.24				
α-Ala			1968.58				
Tvr					207.66	129.62	
Gaba			1357.27				
α-Aba			575.42				
Met				2324.02			
Val			1458.38	3841.33			
Trp			93.44				150.56
Phe					3504.35	23.41	
Ile				3630.20			
Leu			52.54	6772.50			
Lys			3286.61	1225.50			

Otras alícuotas de las 7 fracciones fueron analizadas por RP-HPLC, a 214 nm y a 280 nm. En la **Figura 36** se muestran los cromatogramas de las 4 primeras fracciones y en la **Figura 37** los perfiles cromatográficos de las fracciones 5, 6 y 7. Se determinó el porcentaje de péptidos hidrófilos e hidrófobos de las dos fracciones estudiadas con mayor contenido en péptidos, tomando como punto de división el minuto 20 del cromatograma, que corresponde al Trp. En la fracción 1 predominan los péptidos hidrófilos (83.15%) mientras que la fracción 2 presenta mayor porcentaje de de hidrófobos (61.96%).

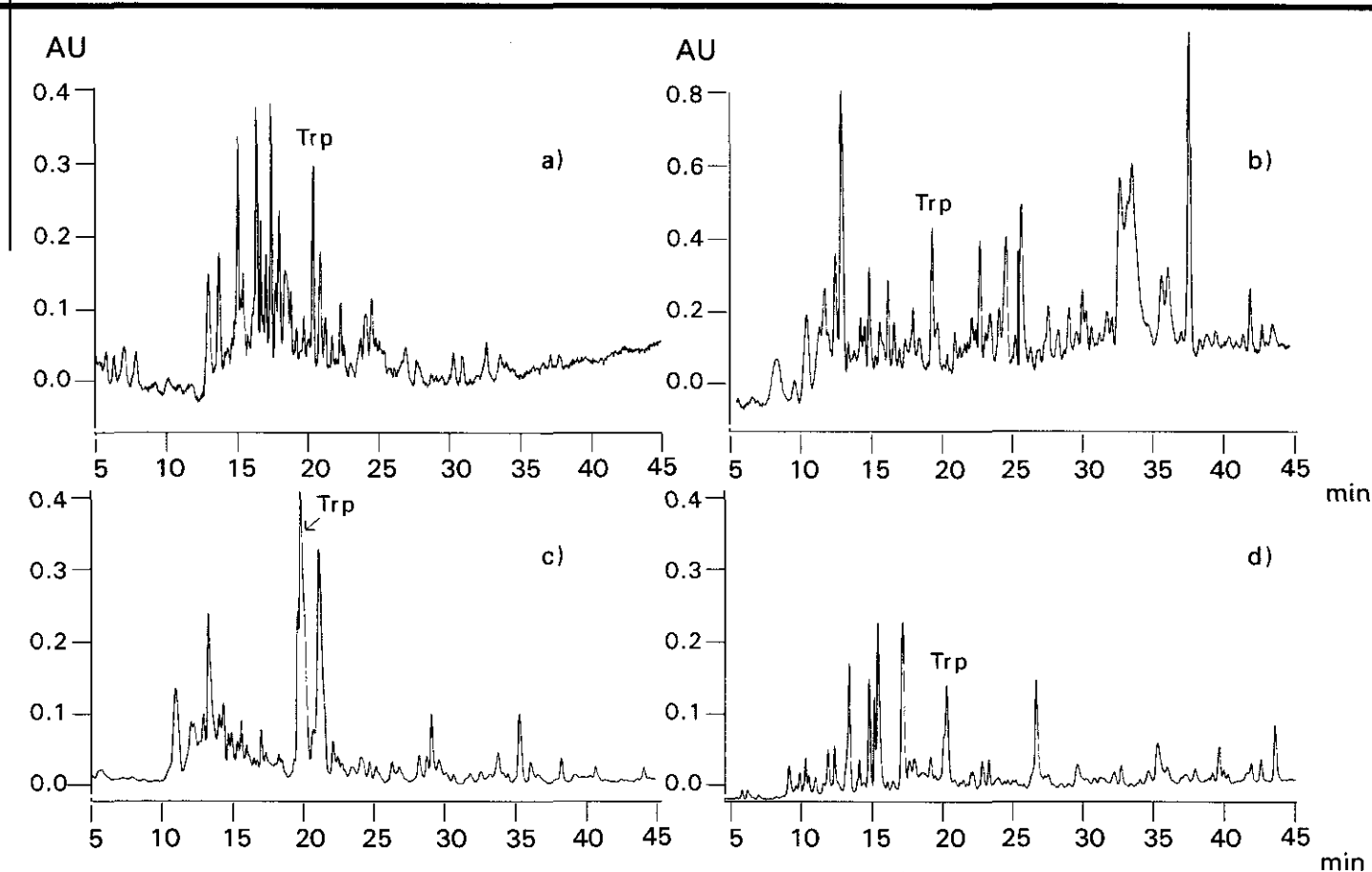


Figura 36: Cromatogramas de las fracciones 1-4 del WSNF < 1 000 D obtenidas por GPC. a) fracción 1; b) fracción 2 (téngase en cuenta la diferente escala); c) fracción 3 y d) fracción 4.

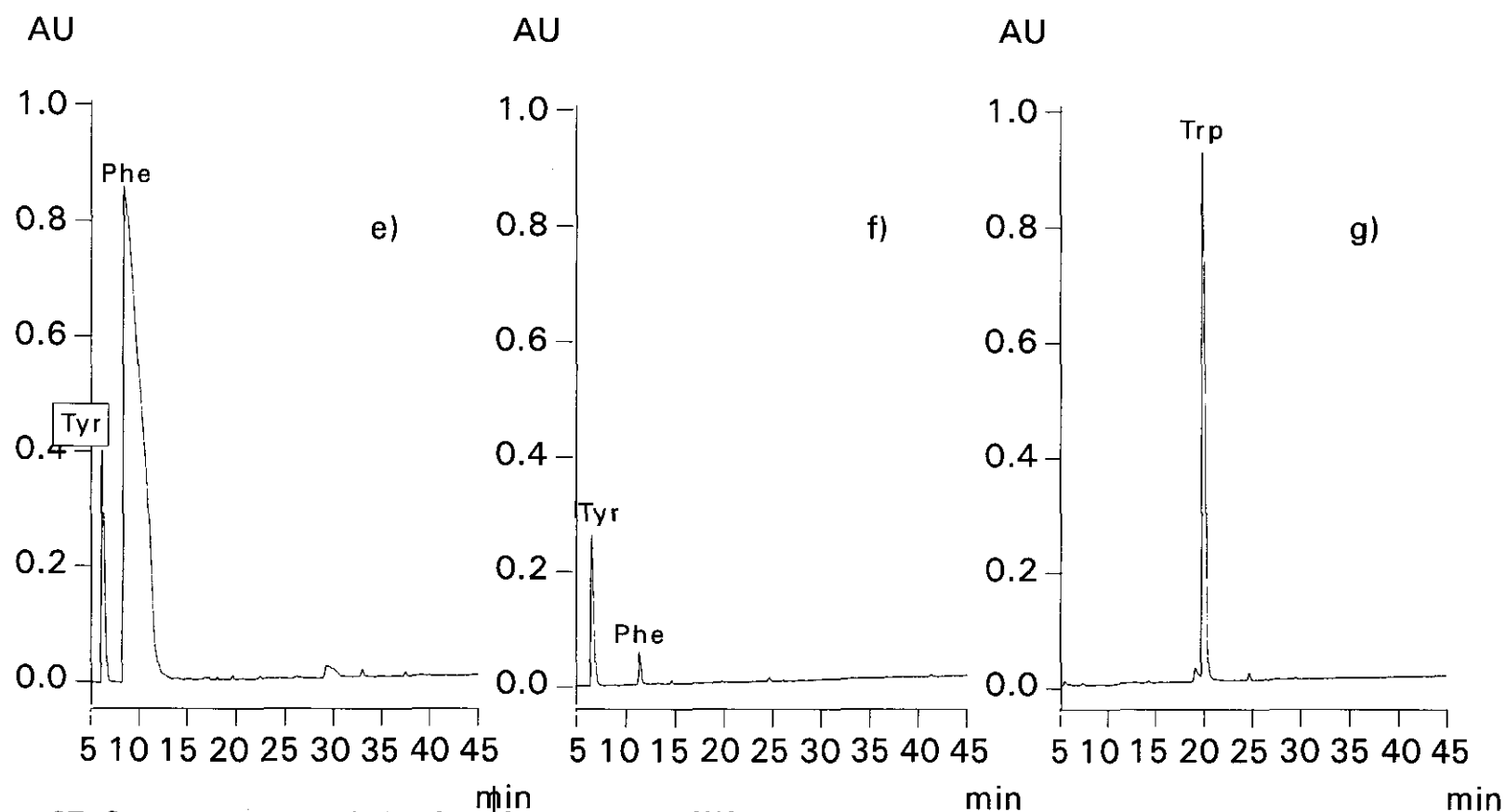


Figura 37: Cromatogramas de las fracciones 5-7 del WSNF < 1 000 D obtenidas por GPC. a) fracción 5; b) fracción 6 y c) fracción 7.

En la **Tabla 19**, se muestran los resultados del análisis sensorial y su correlación con la presencia de los aminoácidos y la concentración de iones anteriormente descritos.

Tabla 19. Datos más significativos del análisis de la WSNF < 1 000 D

	AÁ MAYORITARIOS	IONES (mg/Kg queso)	% PÉPTIDOS HIDRÓFOS S	ANÁLISIS SENSORIAL
FR 1	Glu, Asp	476	16.85	UMAMI
FR 2	Glu, Asp	8 500	61.96	ÁCIDO y AMARGO
FR 3	Asn, Gln, Val, Lys, α -Ala	11 300		SALADO
FR 4	Met, Val, Ile, Leu, Lys	16 000		SALADO
FR 5	Tyr, Phe	150		AMARGO
FR 6	Tyr, Phe	100		AMARGO
FR 7	Trp	66		AMARGO

De esta forma se puede afirmar que las fracciones 1 y 2 están formadas principalmente por péptidos, pues sólo fueron determinados Asp y Glu como aminoácidos libres y el perfil peptídico muestra un elevado número de picos. La presencia de residuos Asp y Glu se relaciona con el sabor "umami" cuando están presentes en péptidos (Roudot-Algaron, 1996). Este intenso sabor fue detectado por el panel de expertos catadores en esta fracción. Aunque los sabores amargos poco deseables de los quesos han sido asociados tradicionalmente con los péptidos hidrófobos determinados en columnas de fase inversa (Cliffe y col., 1989), existen estudios que han demostrado que tanto los péptidos hidrofóbos como los hidrófilos pueden ser amargos (Lee y Warthesen, 1996), y que los componentes que proporcionan más sabores al

queso son probablemente muy hidrófilos y con unos pesos moleculares correspondientes a tripéptidos o secuencias más pequeñas aún (Engels y Visser, 1994), que por RP-HPLC serán eluidos rápidamente. La fracción 1 predominantemente hidrófila, efectivamente tiene un sabor intenso. La fracción 2 también está formada principalmente por péptidos y tiene gran concentración de residuos Asp y Glu libres que posiblemente contribuyan a intensificar el sabor, pues el Glu, aun en concentraciones muy pequeñas, es un potenciador del sabor (Aston y Creamer, 1986), así esta fracción fue catalogada en el análisis sensorial como ácida y amarga con una intensidad muy fuerte. La fracción 3, que presenta un perfil peptídico más sencillo, probablemente esté formada por aminoácidos libres, debido a las elevadas concentraciones en que se han encontrado, siendo los más relevantes Asn, Gln, α -Ala, Val y Lys. Todos estos aminoácidos proporcionan sabores insulsos, ligeramente amargos, excepto la Gln que tiene un sabor ácido-dulce (Roudot-Algaron, 1996). La fracción 4 está compuesta por los aminoácidos libres, Met, Val, Ile, Leu, Lys, entre los que habría que destacar Met y Leu muy implicados en el sabor general de un queso (Aston y Creamer, 1986). Estas dos últimas fracciones, en las que se percibe sabor salado, se ven influidas por una concentración elevada de iones, que como se ha comentado anteriormente, diversifican los sabores. Por último, las fracciones 5 y 6, están constituidas por dos únicos aminoácidos libres, Tyr y Phe (ambos amargos) y la fracción 7 tiene exclusivamente Trp (también amargo).

3.4. EMPLEO CONJUNTO DE TÉCNICAS DE SEPARACIÓN Y MÉTODOS DE INMUNORRECONOCIMIENTO.

3.4.1. Inmunocromatografía

La puesta a punto de inmunoensayos cromatográficos se aborda con el fin de eliminar la lentitud, laboriosidad, baja reproducibilidad y dificultad de automatización que suponen las etapas de incubación y lavado realizadas en los inmunoensayos clásicos y de aumentar la sensibilidad.

Construcción y empleo de la columna de anti- β -LG bovina

En la columna de β -LG-Affi-Prep 10, se inyectó el antisuero anti- β -LG-bovina desarrollado en oveja. Una vez eluida la fracción no retenida del antisuero, quedan en la columna los anticuerpos específicos anti- β -LG-bovina que se eluyen en tres fracciones (**Figura 38**), de las que la primera, que contiene los anticuerpos que eluirían en la fase de detección del análisis y la tercera, con los anticuerpos de mayor afinidad se descartan.

Se comprueba que en la segunda fracción, a pH 2.5, eluyen la mayor parte de los anticuerpos anti- β -LG-bovina, empleándolos para construir la columna de anti- β -LG-bovina (punto 2.4.7 de Materiales y Métodos).

Con el anti- β -LG-bovina desarrollado en oveja purificado, se preparó la columna 2.1 mm de diámetro interno empleando como soporte Affi-Prep Hz, que consiste en grupos hidrazida unidos covalentemente a un polímero a través de un espaciador neutro de 10 átomos. Los grupos hidrazida reaccionan con los grupos carbohidrato de los anticuerpos previamente oxidados a aldehído, formando enlaces hidrazona. Puesto que los carbohidratos se encuentran en la región constante (Fc) del anticuerpo, los paratopos, es decir las zonas del anticuerpo que reconocen a los epitopos, no se ven modificados y quedan orientados hacia el exterior. De este modo se facilita el reconocimiento antígeno-anticuerpo, al contrario de lo que ocurre con otros métodos de unión de

proteínas no específicos para anticuerpos, donde el acceso a los paratopos puede quedar impedido.

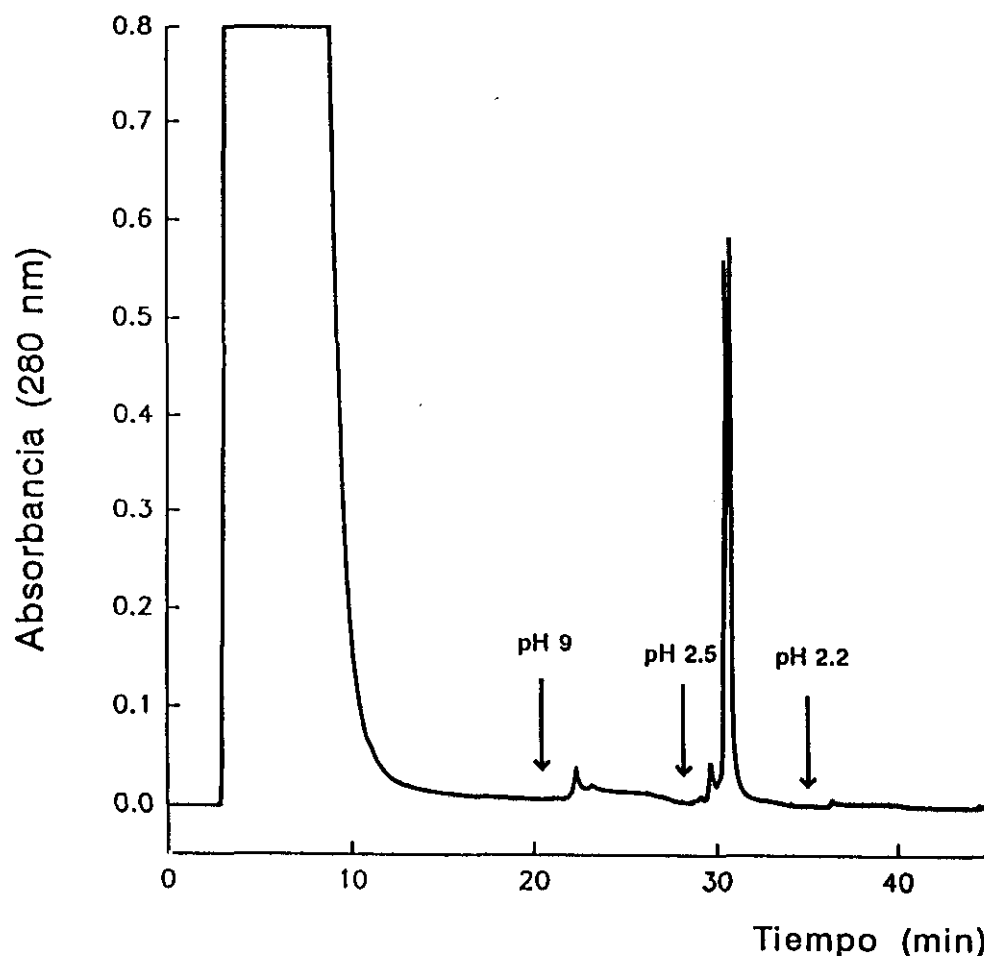


Figura 38: Purificación de anti- β -LG-bovina (desarrollado en oveja) en una columna β -LG-Affi-Prep 10. Fase móvil TBS (Tris Buffer Saline). Flujo 0.5ml/min.

La columna se instaló en un sistema cromatográfico que incluía 3 válvulas. La válvula 1 se empleaba para la introducción del sustrato y del agente de desorción; la válvula 2 permitía interrumpir el flujo a través del capilar, lo que facilita el cambio de fase móvil a un elevado flujo sin distorsionar la columna y permite además realizar incubaciones en el interior del tubo capilar, y por último, la válvula 3 provista de una espira que se empleaba para la introducción de la muestra, del segundo anticuerpo y del tercer anticuerpo marcado. A la salida de esta válvula se conectaba la columna. En este sistema se determinaron los

valores experimentales óptimos para el flujo de fase móvil (0.2ml/min), capacidad de la espira de la válvula de inyección (1 ml) y volumen de inyección del sustrato (1.3 ml). Para eliminar las adsorciones no específicas en la célula del detector se introdujo una válvula adicional (V4), como se muestra en la **Figura 39**, comprobándose que tras sucesivas reutilizaciones se producía pérdida de la capacidad de carga de la columna.

Los ensayos inmunocromatográficos realizados han puesto de manifiesto la gran dependencia de la estabilidad de la columna de inmuoafinidad con su naturaleza. Los resultados publicados con columnas de otra naturaleza empleando las mismas soluciones de unión, detección y desorción empleadas por nosotros, indican la posibilidad de utilizar una misma columna para más de 1000 análisis. En otras ocasiones se ha indicado que las columnas que contienen anticuerpos se deterioran con rapidez, por lo que es necesario continuar los estudios para determinar el origen de la inestabilidad de la columna. Los ensayos realizados han demostrado las ventajas que un sistema de flujo con la posibilidad de incorporación de diversas válvulas tiene para llevar a cabo las etapas de incubación y lavado.

3.4.2. Western blotting

Además de la pérdida de capacidad de carga observada en las columnas inmunocromatográficas, estos sistemas presentan otra limitación que es inherente a su modo de actuación. Al igual que ocurre en los inmunoensayos clásicos los anticuerpos de la columna reaccionan con las moléculas que tienen epitopos comunes originando reacciones cruzadas. Los métodos, que como el Western blotting, incluyen una etapa de separación deben permitir distinguir las β -LG de diferentes especies, que reaccionan con un mismo anticuerpo.

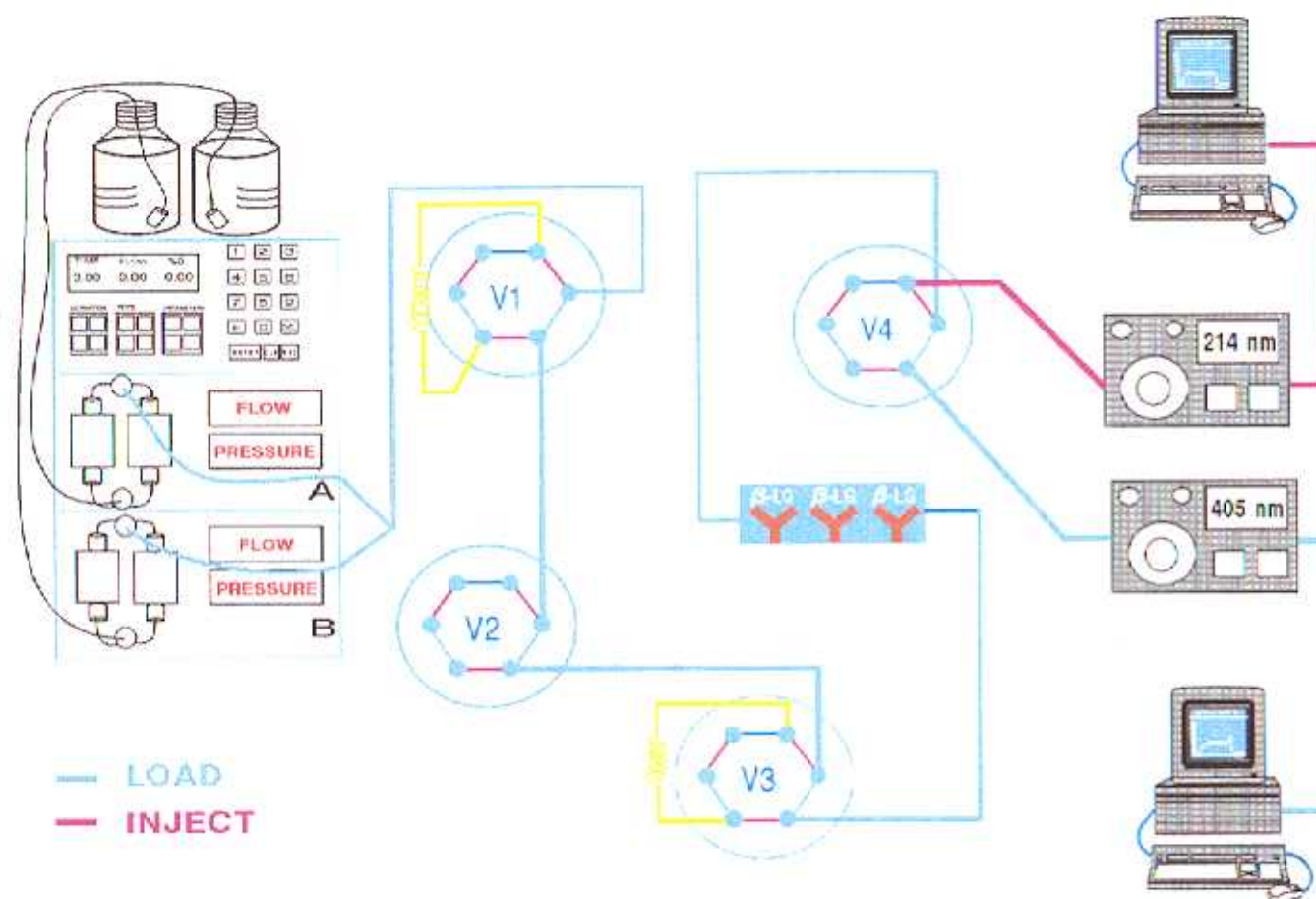


Figura 39: Diseño de la instalación cromatográfica con 4 válvulas preparada para el desarrollo de un método ELISA en columna.

Así pues, los métodos de Western blotting que combinan una separación electroforética, PAGE o IEF, y un inmunoensayo enzimático, parecen ser idóneos para la detección de pequeños porcentajes de leche de vaca (a través de las β -Lg bovinas) en quesos fabricados con leche de otras especies. En un primer paso se realiza la separación electroforética de las proteínas del suero de queso, donde las β -LG de distintas especies quedan separadas por electroforesis o isoelectroenfoque. En segundo lugar, se obtienen menores límites de detección de β -Lg por la elevada sensibilidad de las reacciones enzimáticas.

Especificidad del Western blotting

Se realizaron una serie de experimentos previos, para determinar la efectividad del método de Western blotting para detectar β -Lg nativa y desnaturalizada en leche de vaca. Las β -Lg de leche de vaca se desnaturalizan con calor; según la duración y la temperatura del tratamiento, pueden unirse a las micelas de la caseína o agregarse entre ellas para formar productos poliméricos (Dalglish, 1990). En aquellos métodos en que la β -lg sólo se analiza en la fracción soluble a pH 4.6, la β -Lg asociada a la fracción caseínica no podría ser detectada, proporcionando estimaciones inferiores a las reales o falsos negativos. Además, cuanto más intenso sea el tratamiento térmico, más cantidad de β -Lg será desnaturalizada y más susceptible será de pasar a la fracción caseínica.

En la **Figura 40** se muestra una membrana de transferencia tras las etapas de inmunorreconocimiento y reacción enzimática de las bandas separadas mediante isoelectroenfoque de leche de vaca sometida a diferentes tratamientos térmicos. Las calles 1 a 4 corresponden a la fracción soluble a pH 4.6 de leches de vaca cruda, pasteurizada, UHT y esterilizada. En las calles 5 a 8 se representan para estas mismas leches las fracciones que contienen β -LG desnaturalizada (β -LG DN) la cual fue obtenida mediante la solubilización de β -

LG de la fracción caseínica. Tal y como se observa, los anticuerpos anti- β -Lg bovina reaccionan tanto con la β -LG nativa como con las β -Lg procedentes de la fracción caseínica o β -LG DN.

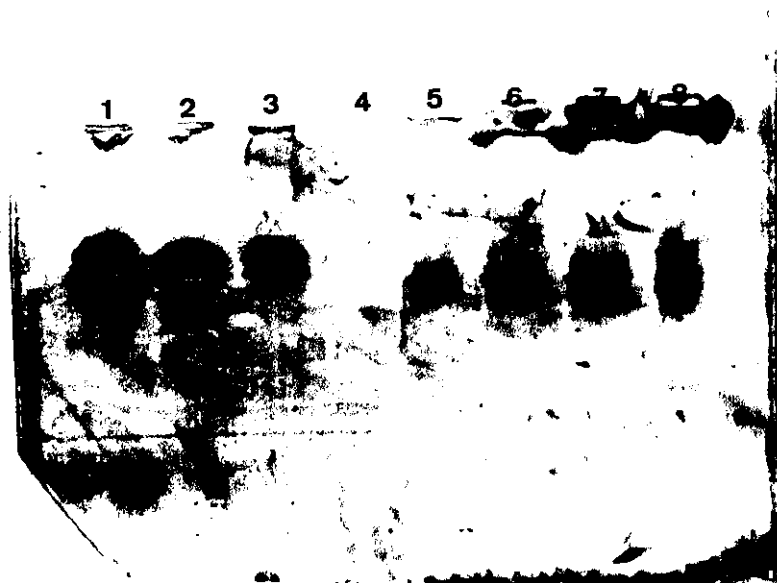


Figura 40: Membrana de Western blotting después de IEF (con gradiente de pH 3-9) de leches de vaca sometidas a diferentes tratamientos térmicos. Calles 1 a 4: fracción soluble a pH 4.6; calles 5 a 8: fracción solubilizada de las caseínas. Calles 1 y 5: leche cruda; calles 2 y 6: leche pasteurizada; calles 3 y 7: leche UHT; calles 4 y 8: leche estéril.

En la membrana se observa que el punto isoeléctrico de las β -LG nativas difiere ligeramente de las β -LG DN, habiendo sido observada esta diferencia entre la forma nativa y la forma desnaturalizada de una proteína en casos similares. Además, la β -LG DN es liberada de su unión a las caseínas empleando β -mercaptoetanol y el pH al que las cadenas de una proteína se liberan se ve afectado por las propiedades del medio.

En la **Figura 40** se pone de manifiesto que cuanto más intenso es el tratamiento térmico mayor es el contenido en β -LG DN y menor en β -LG nativa. El resultado positivo observado en la calle 5, correspondiente a leche cruda de vaca, podría deberse a la presencia de β -LG residual en la fracción de las caseínas. Makinen-kiljunen y Palosuo (1992) usando un método ELISA encontraron un 5% de β -LG en un patrón comercial de α -CN. En la calle 8, donde aparece la β -LG existente en la fracción caseínica de leche esterilizada, se observa una débil señal si se compara con el resto de las leches; esto puede deberse a la alteración de algunos epitopos del antígeno causada por la desnaturalización. En un estudio realizado por Kaminogawa y col. (1993), con anticuerpos monoclonales anti- β -LG, observaron que algunos de ellos reaccionan preferentemente con β -LG nativa mientras que otros muestran reacciones más fuertes con β -LG desnaturalizada. Este mismo estudio demuestra que el calor induce un cambio conformacional en la β -LG empezando por una región ordenada al azar seguida por el cambio de la estructura de la α -hélice. Por lo tanto, parece factible que durante un tratamiento térmico severo se produzcan modificaciones en la estructura secundaria de determinadas regiones polipeptídicas de la β -LG que alteran el reconocimiento entre el antígeno y el anticuerpo policlonal.

Estos ensayos se realizaron tanto con antisueros comerciales como con los proporcionados por el Prof. Calvo, obteniendo resultados similares con ambos.

❏ Sensibilidad del método

Con el fin de evaluar la sensibilidad del método se utilizaron diferentes concentraciones de β -LG AB bovina en agua. Se analizaron mediante Western Blotting alícuotas de 1 μ L, sometidas a IEF o PAGE nativa, procedentes de una serie de diluciones, desde 5 a 500 μ g/L, de β -LG sin tratar y de β -LG calentada a 90°C durante 15 minutos (**Figura 41**). Se comprobó que los anticuerpos reaccionaban con ambos tipos de β -LG, pero los límites de detección

resultaron diferentes para la nativa y la desnaturalizada, hecho que era de esperar por los cambios producidos en los epitopos de los antígenos a consecuencia de la desnaturalización.

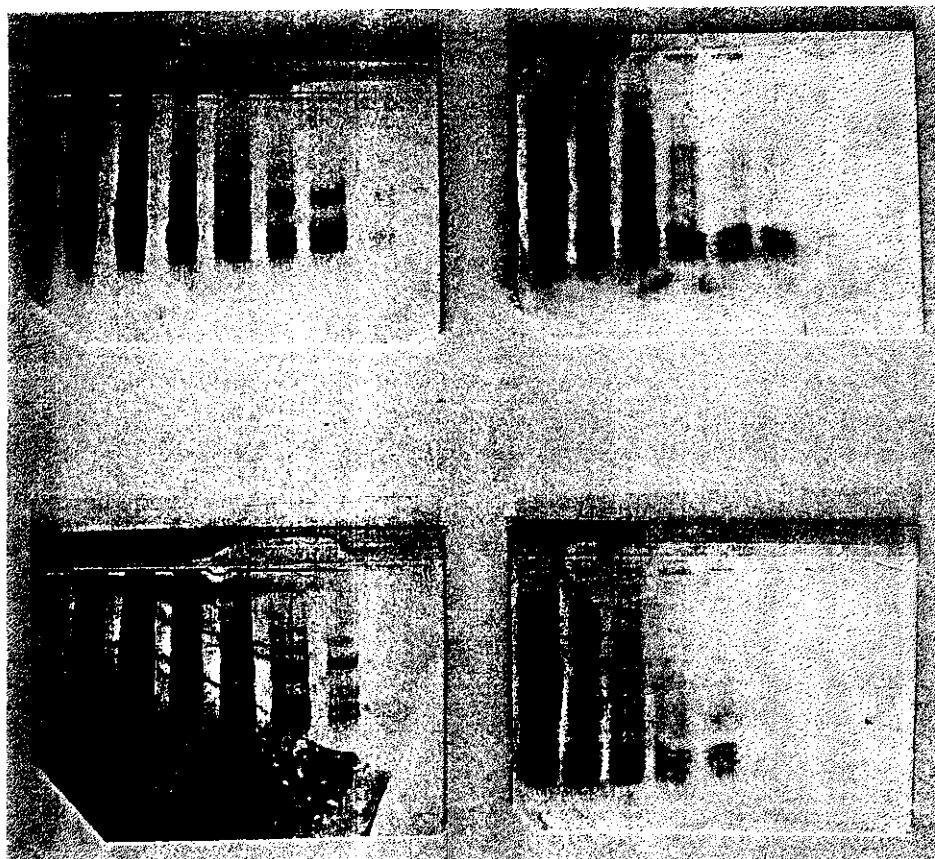


Figura 41: Membranas de Western blotting de diferentes concentraciones de β -lactoglobulina AB bovina patrón entre 5 y 500 $\mu\text{g/l}$. En la zona superior de la figura, muestras de β -lactoglobulina nativa, a) después de PAGE nativa y b) después de IEF. En la zona inferior de la figura, muestras de β -lactoglobulina calentada a 90 $^{\circ}\text{C}$, 15 minutos, c) después de PAGE nativa y d) después de IEF.

El examen visual de la membrana de nitrocelulosa permite detectar hasta 10 $\text{pg}/\mu\text{L}$ de β -LG nativa que correspondería a 10 μg de β -LG bovina en 1 L de leche. Para la β -LG DN el límite de detección es 5 veces mayor. La sensibilidad

del método es ligeramente menor que la detectada por Levieux y Venien (1992) usando un ELISA sandwich con dos anticuerpos monoclonales, uno de los cuales era específico para β -LG bovina.

■ Detección de β -Lactoglobulina nativa y desnaturalizada en quesos

En cuanto a la detección de β -LG nativa y desnaturalizada en quesos, la **Tabla 22** muestra los resultados del análisis de 58 muestras de quesos efectuado mediante IEF de la β -LG aislada de la fracción caseínica, seguido de reconocimiento inmunológico con antisuero comercial anti- β -LG bovina. Como se indica en Materiales y Métodos, las muestras procedían de quesos elaborados a partir de leche de oveja, de cabra, de cabra y oveja o de cabra, oveja y búfala fabricados con diferentes tecnologías y con distintos grados de maduración; que contenían cantidades variables (de 0 a 5%) de leche de vaca pasteurizada o UHT, o bien proteínas de suero de leche de vaca desnaturalizadas. Las 58 muestras de quesos eran muestras ciegas, de las que no se conocía la cantidad de leche de vaca añadida cuando se realizó el análisis. El contenido real se proporcionó posteriormente por el Grupo V1.D1 de Expertos de la Leche y Productos Lácteos de la Unión Europea. La estimación visual de la intensidad de las bandas se hizo comparándola con la obtenida para los quesos patrones.

Comparando los resultados experimentales con los reales se obtuvo, como se muestra en la **Tabla 22** un 100% de concordancia entre el contenido real y la estimación visual para aquellas muestras de queso que contienen cantidades superiores al 1% de leche de vaca añadida, independientemente del tratamiento térmico al que había sido sometida la leche o si se habían adicionado proteínas de suero desnaturalizadas, siendo también independiente la tecnología de fabricación y el tiempo de maduración del queso analizado.

TABLA 22. Western blotting de β -LG bovina aislada de la fracción caseínica para la detección de adulteraciones en queso.

CANTIDAD Y TIPO DE LECHE O PROTEÍNA DE VACA AÑADIDA		ESTIMACIÓN VISUAL DE β -LG DN (%)		ACIERTOS (%)
		(n)		
5%	Leche pasteurizada	4	>>*1	100
	Leche UHT	4	>>1	100
	Prot. suero DN	3	>>1	100
2-3%	Leche pasteurizada	3	>>1	100
	Leche UHT	4	>>1	100
	Prot. suero DN	5	>>1	100
1.5%	Leche UHT	1	>1	100
1%	Leche pasteurizada	4	>1	50
	Leche UHT	5	=1	100
	Prot. suero DN	3	\geq 1	33.3
0- .5%	Leche pasteurizada	6	<1	100
	Leche UHT	10	\leq 1	100
	Prot. suero DN	6	\leq 1	83.3

* >>1 equivale a una estimación del 2% en adelante

Los resultados obtenidos por estimación visual de la membrana de nitrocelulosa y el contenido real de las muestras de queso se corresponden exactamente para las muestras con un contenido en leche de vaca inferior al 1%, siempre que esta leche de vaca fuese pasteurizada o UHT, y sólo se cometió un error en el caso de muestras que contenían proteínas de suero bovinas desnaturalizadas a las que se les asignó erróneamente un contenido del 1% en proteínas de suero bovino desnaturalizada para esa muestra de queso cuando en realidad era del 0.5%. La adulteración realizada con un 1% de leche bovina UHT se determinó con un porcentaje de aciertos al 100%,

mientras que se cometieron algunos errores en la asignación visual para contenidos del 1% de leche de vaca pasteurizada o proteínas de suero desnaturalizadas. Estos errores podrían deberse a que para las muestras que tenían añadidas proteínas de suero previamente desnaturalizadas o adición de leches pasteurizada, la proporción de β -LG que se une a las micelas de caseína sería muy pequeña.

Teniendo en cuenta estos resultados, se llevó a cabo un estudio para comprobar si los ensayos podrían ser mejorados mediante el análisis de β -LG nativa en la fracción soluble a pH 4.6.

En la **Figura 42** se muestran los resultados obtenidos por Western blotting de la fracción soluble a pH 4.6 de quesos con leche bovina pasteurizada (**Figura 42a**), leche bovina UHT (**Figura 42b**) y proteínas de suero bovino desnaturalizadas añadidas (**Figura 42c**). Las placas se realizaron mediante la combinación de PAGE nativa y reconocimiento inmunológico con antisueros comerciales policlonales. A la vista de la membrana se pudo comprobar que la α -La bovina y la seroalbúmina no presentan reacciones con el antisuero anti- β -LG bovina.

En la **Figura 43** se muestran los resultados del Western blotting aplicado a la fracción solubilizada de las caseínas (β -LG DN) para muestras de queso a los que se había añadido leche pasteurizada de vaca (**Figura 43a**), UHT (**Figura 43b**) o proteínas de suero bovino desnaturalizadas (**Figura 43c**). El Western blotting se realizó mediante la combinación de IEF y reconocimiento inmunológico con antisuero comercial policlonal.

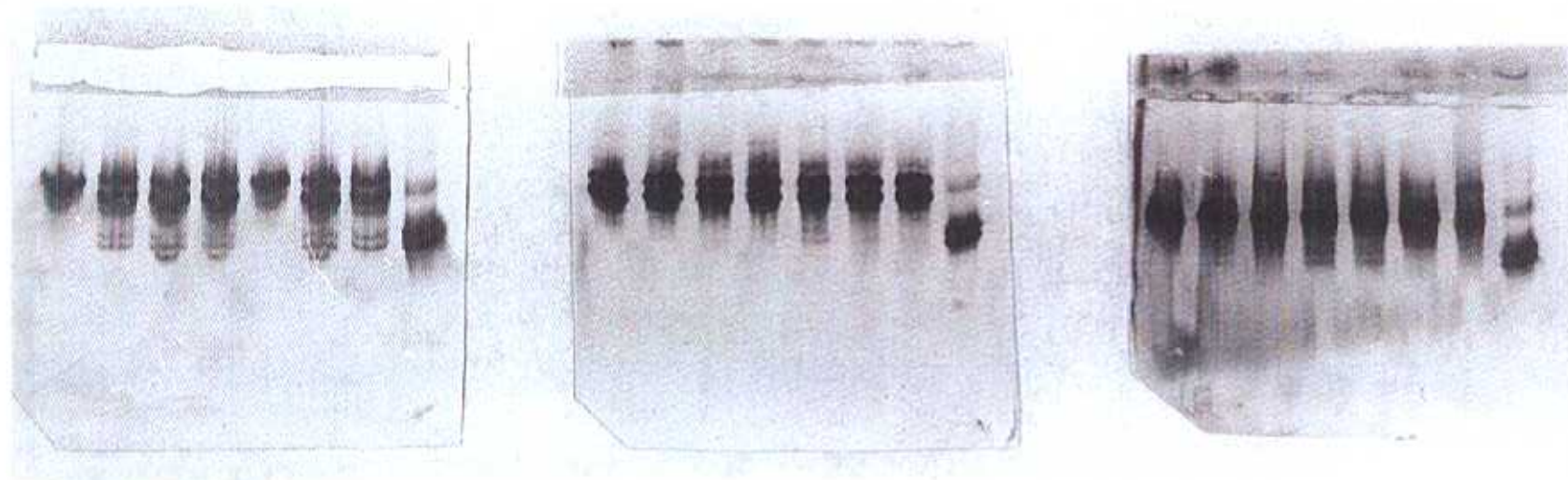


Figura 42: Membranas de Western blotting de PAGE nativa de la fracción soluble a pH 4.6 de A) quesos con leche pasteurizada de vaca añadida, correspondiendo los siguientes porcentajes a las calles 1 a 8 respectivamente: patrón 0%, patrón 1%, patrón 3%, 1, 0, 5, 3 y 50%; B) quesos con leche UHT de vaca añadida, correspondiendo los siguientes porcentajes a las calles 1 a 8 respectivamente: patrón 0%, patrón 1%, 0, 1, 5, 2, 0.5 y 50% C) quesos con proteína de suero desnaturalizada de leche vaca, añadida, correspondiendo los siguientes porcentajes a las calles 1 a 8 respectivamente: patrón 0%, patrón 1%, 0.5, 5, 2, 0, 1 y 50%. Las flechas señalan las β -lactoglobulinas bovinas. La aplicación de la muestra se realiza en el cátodo (parte superior de la figura).

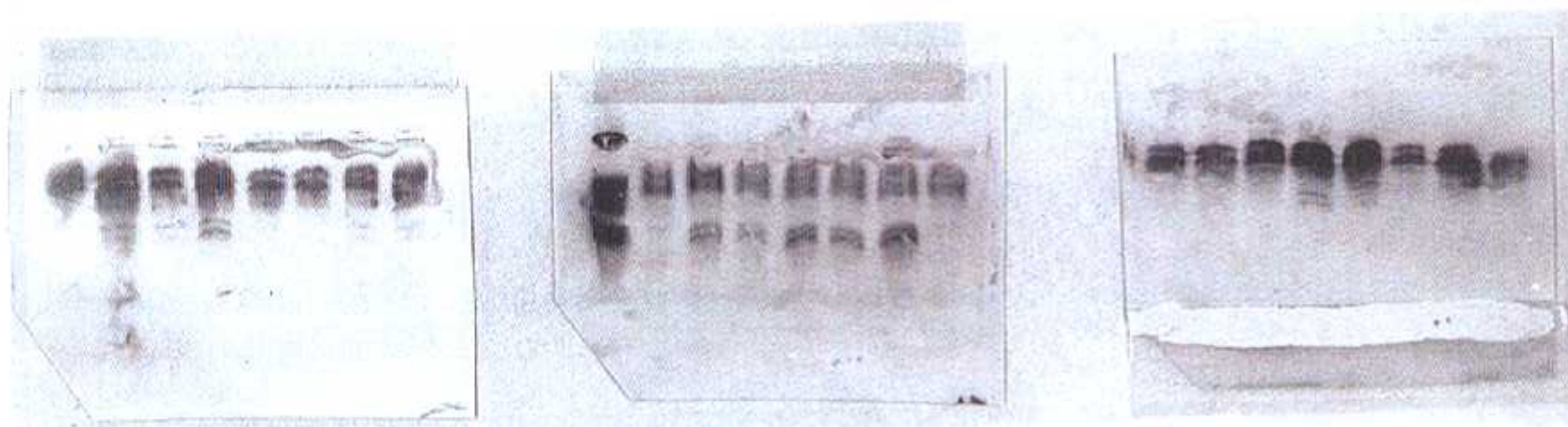


Figura 43: Membranas de Western blotting de IEF (gradiente de pH 3-9) de la fracción solubilizada de las caseínas de A) quesos con leche pasteurizada de vaca añadida, correspondiendo los siguientes porcentajes a las calles 1 a 8 respectivamente: 0, 1, 3, 5, patrón 1%, patrón 0%, 3 y patrón 3%, B) quesos con leche UHT de vaca añadida, correspondiendo los siguientes porcentajes a las calles 1 a 8 respectivamente: 50, patrón 0%, patrón 1%, 0.5, 2, 1, 5 y 0 C) quesos con proteína de suero desnaturalizada de leche vaca, añadida, correspondiendo los siguientes porcentajes a las calles 1 a 8 respectivamente: patrón 0%, patrón 1%, 0.5, 5, 2, 0, 1 y 50%. Las flechas señalan las β -lactoglobulinas bovinas. La aplicación de la muestra se realiza en el cátodo (parte superior de la figura).

Tanto la **Figura 42** como la **43** ponen de manifiesto la importancia de una etapa previa de separación (PAGE o IEF) antes del reconocimiento inmunológico, por las reacciones cruzadas entre las β -LG ovinas y caprina con el antisuero anti- β -LG bovina. Estas reacciones cruzadas, debidas a la gran homología entre las β -LG de diferentes especies, suponen un impedimento para todos aquellos métodos en los que no esté incluido una etapa de separación. En estos casos, utilizando un sólo anticuerpo, no es posible la discriminación de diferentes especies. Para las técnicas de Western blotting, las diferencias en la movilidad electroforética o en el punto isoeléctrico de las β -LG de vaca, cabra y oveja permiten determinar la presencia de β -LG bovina. En la **Tabla 23** se muestra la estimación de β -LG por Western blotting incluyendo los resultados de las **Figuras 42 y 43**.

TABLA 23. Estimación del porcentaje de leche o proteína bovinas añadida por estimación visual de la β -LG bovina por Western blotting.

% DE LECHE O PROTEÍNA AÑADIDA	PORCENTAJE ESTIMADO DE					
	LECHE PASTERIZADA		LECHE UHT		PROTEÍNA DE SUERO	
	(1)	(2)	(1)	(2)	DN ¹	
0	NB ²	NB	NB	NB	NB	NB
0.5	< 1	NB	NB	< 1	< 1	NB
1	= 1	?? ³	??	= 1	= 1	??
2	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1
5	>> ⁴ 1	>> 1	>> 1	>> 1	>> 1	>> 1

(1) Por análisis de la β -Lg de la fracción soluble a pH 4.6.

(2) Por análisis de la β -Lg de la fracción solubilizada de las caseínas.

¹ Desnaturalizada

² Bandas no observadas

³ Estimación visual imprecisa

⁴ Estimación muy superior de 1.

Esta Tabla pone de manifiesto la importancia de la fracción elegida para determinar β -LG, en función del tratamiento térmico de las proteínas bovinas. Comparando las adulteraciones realizadas en queso con leche pasteurizada y UHT, observamos que al igual que ocurría para las muestras de leche, cuanto menos severo es el tratamiento térmico, mayor es la cantidad de β -LG presente en la fracción soluble a pH 4.6; en cambio, la cantidad de β -LG de la fracción caseínica se ve incrementada con una mayor intensidad del tratamiento térmico. Por tanto, para la adulteración hecha con leche pasteurizada de vaca, no es necesario aislar β -LG a partir de la fracción caseínica, ya que con el Western blot de la fracción sérica es posible detectar menos de un 1% de leche de vaca añadida. Si la adulteración ha sido realizada por la adición de leche bovina UHT resulta más conveniente analizar la β -LG aislada de la fracción caseínica. La adulteración de queso por adición de proteínas de suero desnaturalizadas depende de la forma de inclusión de estas proteínas al queso, ya que dependiendo de su estado, un mayor o menor porcentaje de ellas podrían asociarse con la fracción caseínica. Si la desnaturalización de las proteínas de suero se produce antes de ser añadidas a la leche que se emplea en la elaboración del queso, la asociación con las caseínas durante la fabricación del queso será escasa. La adulteración en estos casos se podría detectar por Western blot de la fracción soluble a pH 4.6, donde se puede detectar menos de un 1% de proteínas desnaturalizadas añadidas al queso.

En los quesos con leche de búfala añadida la detección de β -LG bovina es más complicada. Las β -LG de leche de búfala también dan reacciones cruzadas con el antisuero anti- β -LG bovina y ninguno de los métodos electroforéticos empleados proporciona una buena resolución para la β -LG de búfala y la β -LG B bovina, debido a que los puntos isoelectricos y la movilidad electroforética de las β -LG de ambas especies son muy similares (Di Luccia y col., 1994). Sin embargo, la adulteración se puede observar a través de la β -

LG A bovina, que no se solapa con ninguna proteína propia de la leche de búfala.(Figura 44).

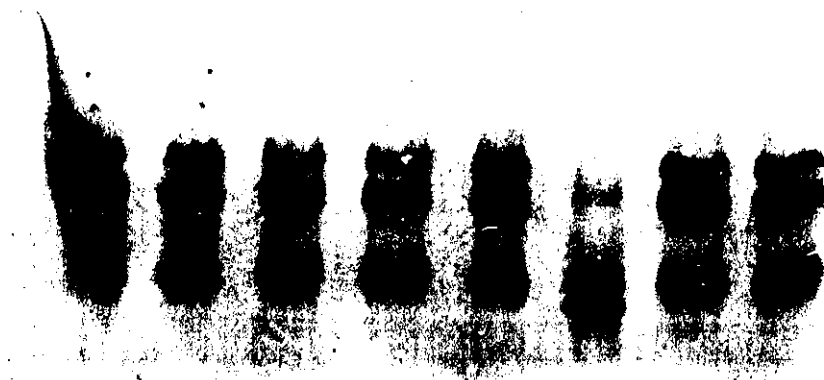


Figura 44: Membrana de inmunoblot de PAGE nativa de la fracción soluble a pH 4.6 de quesos elaborados con leche de oveja, cabra y búfala (1:1:1) (excepto en la calle 6 que corresponde a un suero de leche bovina) conteniendo, de las calle 1 a la 8 respectivamente) los siguientes porcentajes de leche UHT de vaca: 0% (patrón), 1% (patrón), 1, 5, 0.5, 100, 2 y 0%. Las flechas indican la β -LG de búfala y la β -LG B de vaca.

En la práctica para realizar un análisis de adulteración de un queso con leche bovina de origen desconocido, se recurriría a un Western blot de la fracción soluble a pH 4.6. Si la adición se ha producido con más de un 1% de leche de vaca este método permitiría determinar el origen de la misma; sin embargo, si no se observan bandas de β -LG sería necesario confirmar si no ha habido

adulteración o si ésta corresponde a la adición de un porcentaje menor al 1% de leche de vaca UHT. Para confirmar este punto se haría un Western blotting de la β -LG-DN aislada de las caseínas.

Todas las muestras, además de por Western blotting, fueron analizadas por el Método Oficial de Referencia. Los resultados obtenidos por Western blotting para muestras que contienen leche de vaca pasteurizada o UHT añadida mediante este procedimiento coinciden plenamente con los resultados obtenidos por el método oficial de referencia mediante la detección de γ_2 y γ_3 -caseínas, aunque este último método no permite detectar la adición de proteína de suero desnaturalizada bovina. En la **Figura 45**, se muestra una placa de isoelectroenfoque en geles ultrafinos, realizado según este método.

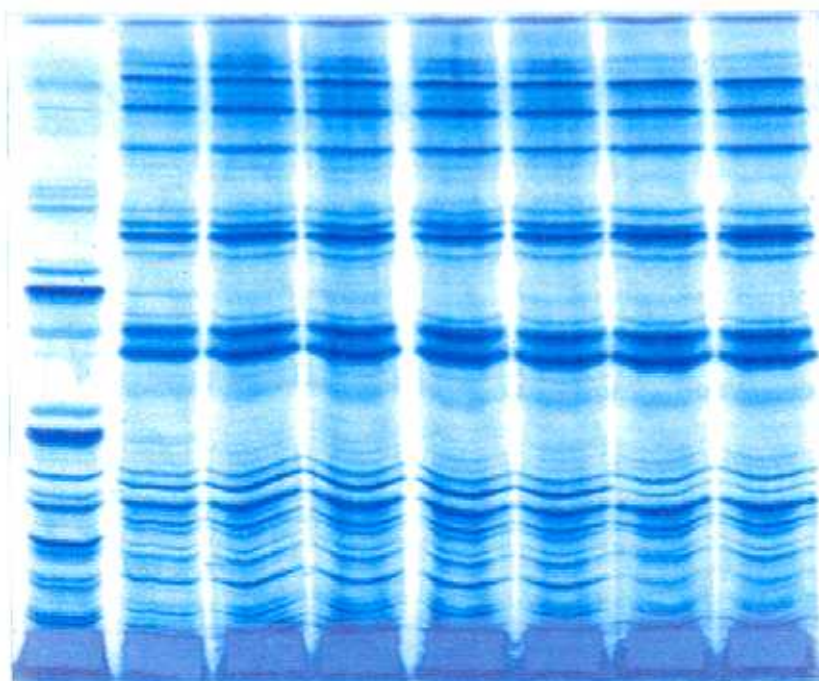


Figura 45: Placa de isoelectroenfoque en geles ultrafinos de la fracción caseínica de quesos de leche de XXXX, con leche de XXXX añadida. Calle 1: patrón 0%; calle 2: patrón 1%; calles 3-7: quesos con x,x,x,x y x% de leche XXX añadida; calle 8: caseína de leche de vaca.

Como se observa, las γ_2 y γ_3 -caseínas de leche de vaca permiten su diferenciación de las γ_2 y γ_3 -caseínas de leche de oveja y cabra. En la placa se muestran quesos elaborados con leche xxx, a los que se había añadido xxx.

Validación del método y certificación del material de referencia

El método se ha validado analizando 14 muestras ciegas de cuajadas con un 0 ó un 1% de leche de vaca añadida, además de dos muestras de cuajada con 0 y 1% de leche de vaca añadida respectivamente. Estas muestras fueron preparadas en el Instituto de Materiales de Referencia y Medidas (IRMM) de la Unión Europea, formando parte de un Proyecto Europeo para certificación de cuajadas de leche de oveja y cabra con 0 y 1% de leche de vaca. Las muestras fueron analizadas por Western blotting y por isoelectroenfoque en geles ultrafinos obteniendo los mismos resultados, que coincidieron plenamente con los proporcionados con posterioridad por el Instituto de Materiales y Medidas de Referencia. El porcentaje de aciertos obtenidos, tanto por el método de Western blotting como por el método de las γ_2 -CN fue del 100%.

CONCLUSIONES

1. Las técnicas electroforéticas mono y bidimensionales, aplicadas al estudio de la fracción caseínica de quesos de leche de vaca, oveja y cabra permite la caracterización de los mismos, al presentar cada especie perfiles electroforéticos diferentes. La electroforesis capilar, proporciona una separación rápida de las caseínas y sus productos de degradación en leche y queso, habiéndose identificado estos componentes en quesos de leche de oveja y cabra.
2. Las técnicas de regresión multivariante: regresión en componentes principales y por regresión por mínimos cuadrados parciales, permiten la determinación de porcentajes de leche de vaca, oveja y cabra en quesos de mezcla, obteniendo errores medios en predicción en torno al 6%.
3. El método de electroforesis capilar puesto a punto en este trabajo, permite la separación y cuantificación de las principales proteínas de suero de leche de vaca, en tiempos inferiores a 12 minutos. Con este método se ha observado que el genotipo de β -lactoglobulina influye en el contenido total de seroproteínas de la leche.
4. Los perfiles peptídicos de los quesos de leche de vaca, oveja y cabra, son característicos para la leche de cada especie. El análisis de la fracción del nitrógeno soluble en agua de peso molecular inferior a 1 000 D, en quesos de oveja, permite correlacionar la presencia de determinados aminoácidos e iones con el aroma y sabor del queso.
5. El método de Western blotting desarrollado, permite la detección de leche de vaca en quesos de leche de oveja, cabra, búfala, o sus mezclas, independientemente del tratamiento térmico que haya sufrido la leche o proteínas bovinas con las que se haya cometido la adulteración, con límites de detección de 10 pg/ μ L para β -lactoglobulina nativa bovina y 50 pg/ μ L para β -lactoglobulina desnaturalizada bovina.
6. Con este método de Western blotting se han detectado niveles de adición de leche de vaca pasteurizada, UHT o proteína de suero bovino desnaturalizada, inferiores al 1% en quesos fabricados con leches de oveja, cabra y búfala y sus mezclas, elaborados con diferentes tecnologías.

BIBLIOGRAFÍA

- ADDEO, F.; Anelli, G.; Stingo, C.; Chianese, L.; Petrili, P.; Scudiero, A. 1984. Riconoscimento e dosaggio del latte bovino nel formaggio pecorino. *Latte* 9:37.
- ADDEO, F.; Anelli, G.; Chianese, L. 1986. Gel isoelectric focusing of cheese proteins to detect milk from different species in mixture. *Int. Dairy Fed. Doc.* 202:191.
- ADDEO, F.; Moio, L.; Chianese, L.; Stingo, C. 1990. Improved procedure for detecting bovine and ovine milk mixtures in cheese by isoelectric focusing of para- κ -casein. *Milchwissenschaft* 45:4.
- ADDEO, F.; Moio, L.; Chianese, L.; Stingo, C.; Resmini, P.; Beiner, I.; Krause, I.; Di Luccia, A.; Bocca, A. 1990. Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2 -caseins. *Milchwissenschaft* 45 (11):708.
- ADDEO, F.; Nicolai, M.A.; Chianese, L.; Moio, L.; Spagna Musso, S.; Bocca, A.; Del Giovine, L. 1995. A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting. *Milchwissenschaft* 50:83.
- ALICHANIDIS, E.; Polychroniadou, A. 1995. Special features of dairy products from ewe and goat milk from the physicochemical and organoleptic point of view. *Proceedings of the IDF/ Greek National Committee of IDF/ CIRVAL Seminar*.
- AMIGO, L.; Santamaría, G.; Gonzalez de Llano, G.; Ramos, M. 1986. Polyacrylamide gel electrophoresis of whey proteins in cheeses made from milk of different species. *Int. Dairy Congress. La Haya (Holanda)*.

- AMIGO, L.; Ibáñez, I.; Fernández, C.; Santa-María, G.; Ramos, M. 1989. Comparison of an electrophoretic and an immunological method for the determination of goats' and cows' milk in cheeses. *Milchwissenschaft* 44:215.
- AMIGO, L.; Ramos, M.; Martín-Álvarez, P.; Barbosa, M. 1991. Effect of technological parameters on electrophoretic detection of cows' milk in ewes' milk cheeses. *J. Dairy Sci.* 74:1482.
- AMIGO, L.; Ramos, M.; Calhau, L.; Barbosa, M. 1992. Comparison of electrophoresis, isoelectric focusing, and immunodiffusion in determinations of cows and goats milk in Serra da Estrella Cheese. *Lait* 72:95.
- ANDRADE, J.M.; Prada, D.; Muniategui, S.; Gómez, B.; Pan, M. 1993. Multivariate Selection of variables in Industrial Quality Control: Optimizing Aviation Fuel Final Control. *J. Chemometr.* 7:427.
- ANDREWS, A.T. 1983. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Res.* 50:45.
- ANDREWS, A.T.; Alichanidis, E. 1983. Proteolysis of caseins and the protease-peptone fraction of bovine milk. *J. Dairy Res.* 50:275.
- ARANDA, O.; Sánchez, L.; Pérez, M.D.; Ena, P.; Puyol, R.; Oria, R.; Calvo, M. 1993. Rapid immunoenzymatic method for detecting adulteration in ewes' milk. *Food Control* 4:101.
- ASCHAFFENBURG, R.; Dance, J.E. 1968. Detection of cow's milk in goat's milk by gel electrophoresis. *J. Dairy Res.* 35:383.

- ASTON, J.W.; Creamer, L.K.. 1986. contribution of the components of the water-soluble fraction to the flavour of Cheddar cheese. *New Zea. J. Dairy Sci. Tech.* 21:229.
- BANKS, J. M. 1990. Improving cheese yield by the incorporation of whey powder. 1990. *Dairy Ind. Int.* 55:37.
- BANKS, J.M.; Muir, D.D. 1985. Effect of incorporation of denatured whey proteins on yield and quality of Cheddar cheese. *J. Soc. Dairy Technol.* 38:27.
- BARBOSA, M.; Gonçalves, I. 1989. Detection of goat and cow milk in fresh ewe cheese using the radial immunodiffusion method. *Bull. Int. Dairy Fed. Doc.* 202:188.
- BICAN, P.; Spanhi, A. 1991. Low molecular-mass nitrogen components in ripening cheese. *Lebensm. Wiss. Technol.* 24:315.
- BIEDE, S.L.; HAMMOND, E.G. 1979. Swiss cheese flavor:I. chemical analyses. *J. Dairy Sci.* 62:238.
- BLANCO, M.; Coello, J.; Mashoch, S.; Ruiz, A. 1994. Calibración Multivariada: Regresión en Componentes Principales (PCR) y Regresión Parcial con Mínimos Cuadrados (PLSR). En: "*Avances en Quimiometría Práctica*". Ed por Cela R. Universidad de Santiago de Compostela.
- BOCK, S.A. 1987. Prospective appraisal of complants of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics* 79:683.
- BOE nº 135 de 27 del Julio de 1987. Normas de Composición y Características Específicas de los quesos Hispánico, Ibérico y de la Mesta.

- BRERETON, R.G. 1990. *Chemometrics: Applications of Mathematics and Statistics to Laboratory Systems*. Ellis Horwood Limited, Chichester.
- CALVO, M.; Aranda, P.; Sánchez, L.; Pérez, M.D.; Ena, J.M. 1989. Método inmunoenzimático rápido para la detección de la presencia de distintas especies en leche de oveja. Patente nº P-8902690.
- CALVO, M.M.; Leaver, J.; Law, A.J.R.; Banks, J.M. 1992. Analysis of the whey protein fraction during ripening of cheddar type cheese containing heat-denatured β -lactoglobulin. *Milchwissenschaft* 47:343.
- CAPILLA, C.; Navarro, J.L.; Sendra, J.M.; Izquierdo, L. 1988. Detection of orange juice dilution by canonical correlation analysis. *Anal. Chim. Acta* 212 (1/2):309.
- CATTANEO, T.M.P.; Saita, A.S.; Toppino, P.; Daghetta, A. 1989. Identification of milk from different species in mixed milk: electrophoretic and immunological methods. *Sci. Tecn. Latt-cas.* 40:173.
- CATTANEO, T.M.P.; Nigro, F.; Greppi, G.F. 1996. Analysis of cow, goat and ewe milk mixtures by Capillary Zone Electrophoresis (CZE): preliminary approach. *Milchwissenschaft* 51(11):616.
- CIFUENTES, A.; Frutos de, M.; Díez-Masa, J.C. 1993. Analysis of whey proteins by capillary electrophoresis using buffer-containing polymeric additives. *J. Dairy Sci.* 76:1870.
- CIFUENTES, A.; Frutos, M. de; Díez-Masa, J.C. 1994. Polymeric networks vs. crosslinked gels for CE separations of whey proteins. *Am. Lab.* 8:46.
- CLAIRE, R.L. St. 1996. Capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 68:569R.

- CLIFFE, A.J.; Revell, D.; Law, B.A. 1989. A method for the reverse phase high performance liquid chromatography of peptides for Cheddar cheese. *Food Chem.* 34:147.
- CLIFFE, A.J.; Marks, J.D.; Mulholland, F. 1993. Isolation and characterization of non-volatile flavours from cheese: peptide profile of flavour fractions from Cheddar cheese, determined by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Int. Dairy J.* 3:379.
- COBB, K.A.; Novotny, M. 1989. High-sensitive peptide mapping by capillary zone electrophoresis and microcolumn liquid chromatography using immobilized trypsin for protein digestion. *Anal. Chem.* 61:2226.
- COLBURN, J.C. 1992. Capillary electrophoresis separation of peptides: practical aspects and applications. In: *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*; Grossman, P.D.; Colburn, J.C.; Academic Press, London and San Diego.
- CRABTREE, H. J.; Ireland, J.D.; Dovichi, N.J. 1994. Effect of acetonitrile in the sampling solution on the analyte peak shape in micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. A* 669:263.
- CREAMER, L.K., Olson, N.F. 1982. Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. *J. Food Sci.* 47:631.
- CROW, V.L.; Coolbear, T.; Gopal, P.K.; Martley, F.G.; McKay, L.L.; Riepe, H. 1995. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *Int. Dairy J.* 5:855.
- DALE, C.J.; Young, T.W. 1989. Fractionation of small peptides from beer. *J. Inst. Brew.* 95:35.

- DALGLEISH, D.G. 1987. The enzymatic coagulation of milk. En Cheese: chemistry, physics and microbiology. De. P.F Fox. Elsevier Applied Science Publishers. London, 1:63.
- DI LUCCIA, A.; Mauriello, R.; Addeo, F. 1986. Identification of caprine casein variants by electrophoretic techniques. *Prot. Biol. Fluids* 34:903.
- DIXON, W.J. 1988. BMDP Statistical Software Manual. University of California Press, Los Angeles. California.
- DOCE nº 690/92 del 19 de Marzo de 1992. Método de referencia para la Detección de Caseína de Leche de Vaca en Quesos de Leche de Oveja.
- DRAPER, N. R.; Smith, H. 1981. Applied regression analysis. Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
- ELBERTZHOGEN, H. 1987. Detection of bovine, sheep and goat's milk cheeses by immunoelectrophoresis. *Z. Lebensm. Unters For.* 185:357.
- ENGELS W.J.M; Visser, S. 1994. Isolation and comparative characterization of components that contribute to the flavor of different types of cheese. *Neth. Milk Dairy J.* 48:127.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; Mohedano, A.F.; Rico-Miralles, G.; Nuñez, M. 1996. Aplicación de la electroforesis capilar al estudio de la proteólisis en quesos de vaca, oveja o cabra. 8^{as} JAI. Barcelona.
- FOX, P. F. 1989. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Sci.* 72:1379.

- FRITSCH, R.J.; MARTENS, F.; BELITZ, E.H. 1992. Monitoring Cheddar cheese ripening by chemical indices of proteolysis. I. Determination of free glutamic acid, soluble nitrogen, and liberated amino groups. *Z. Lebensm. Unters For.* 41:488.
- FRUTOS DE, M.; Cifuentes, A.; Díez-Masa, J.C.; Amigo, L.; Ramos, M. 1991. Application of HPLC for the detection of proteins in whey mixtures from different animal species. *J. HRCC* 41:289.
- FRUTOS DE, M.; Cifuentes, A.; Amigo, L.; Ramos, M.; Díez-Masa, J.C. 1992. Rapid analysis of whey proteins from different animal species by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Z. Lebensm. Unters For.* 195:1.
- FRUTOS DE, M.; Paliwal, S.K.; Regnier, F.E. 1993. Liquid Chromatography Based Enzyme-Amplified Immunological Assays in Fused-Silica Capillaries at the Zeptomole Level. *Anal. Chem.* 65:2159.
- FRUTOS DE, M.; Regnier, F.E. 1993. Tandem Chromatographic-Immunological Analyses. *Anal. Chem.* 65:17A.
- GARCÍA, T.; Martín, R.; Rodríguez, E.; Morales, P.; Sanz, B.; Hernández, P.E. 1990. Detection of bovine milk in ovine milk by a indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Dairy Sci.* 73:1489.
- GARCÍA, T.; Martín, R.; Rodríguez, E.; Azcona, J.B.; Sanz, B.; Hernández, P. E. 1991. Detection of bovine milk in ovine milk by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Food Protect.* 54:366.

GARCÍA-JARES, C.; Medina, B. 1993."Research on white and red wine blending in the production of rose wines by means of the partial least squares method. *J. Sci. Food Agric.* 63 (3):349.

GELADI, P.; Kowalski, B.R. 1986. Partial Least-Squares Regression: A Tutorial. *Anal. Chim. Acta* 185.

GONZÁLEZ DE LLANO, D.; Polo, M.C.; Ramos, M. 1990. Update on HPLC and HPLC analysis of nitrogen compounds in dairy products. *Lait* 70:255.

GONZÁLEZ DE LLANO, D.; Polo, C.; Ramos, M. 1991. Evolution, isolation and identification of low molecular weight peptides from blue cheeses by HPLC. *J. Dairy Res.* 58:363.

GONZALEZ DE LLANO, D.; Polo, M.C.; Ramos, M. 1995. Study of proteolysis in artisanal cheeses: high performance liquid chromatography of peptides. *J Dairy Sci.* 78:1018.

GROSSCLAUDE, F. 1995. Genetic Polymorphism of milk proteins. *Bull. Int. Dairy Fed.* 304:2.

GROSSMAN, P.D.; Colburn, J.C.; Lauer, H.H.; Nielsen, R.G.; Riggan, R.M.; Sittampalam, G.S.; Rickrad, E.C. 1989. Application of free-solution capillary electrophoresis to the analytical scale separation of proteins and peptides. *Anal. Chem.* 61:1186.

GRUFFERTY, M.B.; Fox, P.F. 1988. Review article: milk alkaline proteinase. *J Dairy Res.* 55:609.

-
- HABIBI-HAJAI, M.B.; Lee, B.H. 1996. Bitterness in cheese: a review. *Crit. Rev. Food Sci.* 36:397.
- HERRÁIZ, T.; Casal, V. 1995. Evaluation of solid-phase extraction procedures in peptide analysis. *J. Chromatogr. A* 708:209.
- JAKOB, E. 1994. Genetic polymorphism of milk proteins. *Bull. Int. Dairy Fed.* 298:17.
- JARRET, W.D.; Aston, J.W.; Dulley, J.R. 1982. A simple method for estimation of free amino acids in Cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* 37:55.
- JONG DE, S. 1993. PLS Fits Closer Than PCR. *J. Chemomet.* 7:551.
- JONG DE, N.; Visser, S.; Olieman, C. 1993. Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 652:207.
- JUÁREZ, M. 1990. Test for fraudulent identification evolving world of milk analysis. *Proceeding of the XXIII. Int. Dairy. congress. Montreal . Canada.*
- JUÁREZ, M.; Ramos, M. 1986. Chromatographic, electrophoretic and immunological methods for detecting mixtures of milk from different species. *Int. Dairy Fed. Bull.* 202:175.
- KRISTIANSEN, K.R.; Otte, J.; Sorensen, N.R.; Qvist, K.B. 1996. In IDF Symposium of Ripening and Quality of Cheeses, Besançon, France.
- KUCHROO, C.N.; Fox, P.F. 1982. Soluble nitrogen in Cheddar cheese. Comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft* 37:651.

- LAEZZA, P.; Nota, G.; Addeo, F. 1991. Determination of bovine and ovine milk in mixtures by fast ion-exchange chromatography of whey proteins. *Milchwissenschaft* 46.
- LARSON, B.L. 1992. Immunoglobulins of the mammary secretions. En: "Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins". Editor Fox, P.F.; Ed. Elsevier Applied Science. New York. pp 231
- LEE, K.D.; Warthesen, J.J. 1996. Mobile phases in reverse-phase HPLC for the determination of bitter peptides in cheese. *J. Food Sci.* 61:291.
- LEMIEUX, L.; Puchades, R.; Simard, R.E. 1989. Size-exclusion HPLC separation of bitter and astringent fraction from Cheddar cheese made with added *Lactobacillus* strains to accelerate ripening. *J. Food Sci.* 54:1234.
- LINDBERG, W.; Oehman, J.; Wold, S.; Martens, H. 1985. Simultaneous determination of five different food proteins by high performance liquid chromatography and partial least squares multivariate calibration". *Anal. Chim. Acta* 174:41.
- LEMIEUX, L.; Simard, R.E. 1992. Bitter flavour in dairy products II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. *Lait* 72:335.
- LEVIEUX, D. 1978. Détection immunologique des mélanges de laits de diverses espèces. XX Congr. Int. Paris 15 Sci Tech.

- LEVIEUX, D; Venien, A. 1994. Rapid, sensitive two-site for detection of cows' milk in goats' or ewes' milk using monoclonal antibodies. *J. Dairy Res.* 61:91.
- LÓPEZ-FANDIÑO, R.; Acedo, I.; Ramos, M. 1993. Comparative study by HPLC of caseinomacropptides from cow's, ewe's and goat's milk. *J. Dairy Res.* 60:117.
- LÓPEZ-FANDIÑO, R.; Olano, A.; Corzo, N.; Ramos, M. 1993. Proteolysis during storage of UHT milk: differences between whole and skim milk. *J. Dairy Sci.* 60:339.
- LÓPEZ-GÁLVEZ, G. 1993. Estudio del polimorfismo de las proteínas de leche de las razas Manchega y Segureña. Aptitud a la coagulación y rendimiento quesero. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- LÓPEZ-GÁLVEZ, G.; Juárez, M.; Ramos, M. 1995. Two dimensional electrophoresis and immunoblotting for the study of ovine whey proteins polymorphism. *J. Dairy Res.* 62:311.
- MACFIE, H.J.H.; Hedderley, D. 1993. Current practice in relating sensory perception to instrumental measurements. *Food Qual. Pref.* 4 (1/2):41.
- MAHÉ, M.F.; Grosclaude, F. 1982. α_{s1} -casein D, another allele associated with a decreades synthesis rate at the caprine α_{s1} -casein locus. *Génét. Sél. Evol.* 21:127.
- MAKINEN-KILJUNEN, S.; Palosuo, T. 1992. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of bovine b-lactoglobulin in infant feeding formulas and in human milk. *Allergy* 47:347.

- MARIAGER, B.; Solve, M.; Eriksen, H.; Brogren, C.H. 1992. Bovine β -lactoglobulin in Hypoallergenic and Ordinary Infant Formulas Measured by an Indirect Competitive ELISA Using Monoclonal and Polyclonal Antibodies. *Immunology*. 6:73.
- MARTENS, M. 1986. Sensory and chemical/physical quality criteria of frozen peas studied by multivariate data analysis. *J. Food Sci.* 51 (3):599.
- MARTENS, M.; Martens, H. 1986. Partial Least Squares Regression. En: *Statistical Procedures in Food Research* Ed por Piggott JR. Elsevier Applied Science, Essex, pp 293.
- MARTENS, H.; Naes, T. 1993. *Multivariate Calibration*. John Wiley & Sons, Chichester.
- MATHESON, A.R. 1981. The immunochemical determination of chymosin activity in cheese. *New Zealand J. Dairy Sci. Techn.* 16:33.
- McSWEENEY, P.L.H.; Olson, N.F.; Fox, P.F.; Haely, A.; Hojrup, P. 1993. Proteolytic specificity of chymosin of bovine α_{s1} -casein. *J. Dairy Res.* 60:401.
- MOIO L.; Chianese, L.; Rivemale, M.; Addeo, F. 1992. Fast detection of bovine milk in Roquefort cheese with PhastSystem by gel isoelectric focusing and immunoblotting. *Lait* 72:87.
- MOLINA, E.; Ramos, M.; Martín-Álvarez, P.J. 1995. Prediction of the percentages of cows', goats' and ewes' milk in "Iberico" cheese by electrophoretic analysis of whey proteins. *Z. Lebensm. Unters. For.* 201:331.

- MONNIG, C.A.; Kennedy, R.T. 1994. Capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, 66, 280R.
- MONTI, J.C. 1993. 1st World Congress of Dairy Products in Human Health and Nutrition. Madrid, 7-10 Junio.
- MOTTAR, J.R.; van Retenghem, R.; de Wilder, J. 1985. Evaluation of raw material for UHT milk by determining the degree of protein breakdown through HPLC. *Milchwissenschaft* 40:717.
- NUÑEZ, M.; Medina, M.; Gaya, P. 1989. Ewes' milk cheese: technology, microbiology and chemistry. *J. Dairy Res.*, 56:303.
- OHYAMA, S.; Ishibashi, N.; Tamura, M.; Nishizaki, H.; Okai, H. 1988. Synthesis of bitter peptides composed of aspartic acid and glutamic acid. *Agr. Biol. Chem. Tokyo* 52:871.
- O'KEEFFE, A.M.; Fox, P.F.; Daly, C. 1976. Contribution of rennet and starter proteases to proteolysis in cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 43:97.
- OLIEMAN, C.; van Riel, J.A.M. 1989. Detection of rennet whey solids in skim milk powder and buttermilk powder with reversed-phase HPLC. *Neth. Milk. Dairy J.* 43:171.
- ORTÍN, L.; Sánchez-Algaba, T.; Domínguez, M.C.; Ortín, F.J. 1992. Quesos frescos y maduros: Determinación de mezclas de leche de cabra, vaca y oveja por isoelectroenfoque sobre gel de poliacrilamida, capa muy fina. (Phast-System). Proteínas séricas en el queso. *Alimentaria* 231:39.

- OTANI, H.; Dong, X.Y.; Hara, T.; Kobayashi, M.; Kayahara, H.; Hosono, A. 1989. Human serum antibodies to cow milk proteins in infants and children having clinically allergy symptoms. *Milchwissenschaft* 44:131.
- PARAF, A. 1992. A role for monoclonal antibodies in the analysis of food proteins. *Trends Food Sci. Tech.* 3:263.
- PHARMACIA LKB. Fast Coomassie staining. *PhastSystem Development Technique File N° 200.*
- PHARMACIA LKB. IEF and electrophoretic titration curve analysis. *PhastSystem Separation Technique File N° 100.*
- PHARMACIA LKB. SDS-PAGE in homogeneous media. *PhastSystem Separation Technique File N° 111.*
- PHARMACIA LKB. Native PAGE in homogeneous media. *PhastSystem Separation Technique File N° 121.*
- PHARMACIA LKB. 1994. PhastGel™ Silver Kit
- PELLEGRINO, L.; De Noni, I.; Tirelli, A.; Resmini, P. 1991. Determinazione del latte di vacca nei formaggi di specie minori mediante HPLC delle sieroproteine. Nota 1ª: Applicazione a lla mozzarella di buffala. *Sci. Tecn. Latt.-cas.* 42 (2):87.
- PELLEGRINO, L.; Tirelli, A.; Masotti, F. 1992. Determinazione del latte di vacca nei formaggi di specie minori mediante HPLC delle sieroproteine. Nota 2ª: Applicazione ai formaggi di pecora. *Sci. Tecn. Latt.-cas.* 43 (5):297.
- PIERRE, A.; Portman, A. 1970. Emploi de l'électrophorese en gel de polyacrilamide pour mettre en evidence et doser le lait de vaches ajouté

- au lait de chèvre. Application au cas de fromages. *Ann. Technol. Agric.* 19:107.
- PIGGOTT, J.R.; Paterson, A.; Clyne, J. 1993. Prediction of flavour intensity of blackcurrant (*Ribesnigrum* L.) drinks from compositional data on fruit concentrates by partial least squares regression. *Int J. Food Sci & Tech.* 28(6):629.
- POLO, M.C.; Gonzalez de Llano, D.; Ramos, M. 1992. Derivatization and liquid chromatographic separation of peptides. In: *Food analysis by HPLC*; Nollet, L.M.L.; Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong.
- RAMOS, M.; Martínez-Castro, I.; Juárez, M. 1977. Detection of cow's milk in Manchego cheese. *J. Dairy Sci.* 60:870.
- RAMOS, M.; Juárez, M. 1981. The composition of ewe's and goat's milk. *Bull. International Dairy Federation* 1.
- RAMOS, M.; Juárez, M. 1984. Update on existing analytical methods for detecting mixtures of cow's, ewe's, and goat's milk. *Inter. Dairy Fed. Bulletin Doc.* 181:3.
- RAMOS, M.; Juárez, M. 1986. Métodos analíticos para la identificación de mezclas de leche de diferentes especies. *Rev. Esp. Lechería* 7:19.
- RAMOS, M.; Amigo, L. 1989. Detección de mezclas de leche de distintas especies en la fabricación de quesos. Últimas tendencias. *Rev. Esp. Lechería* 7:56.
- RAMOS, M.; Juárez, M. 1989. Utilización de leches de oveja y cabra, problemática de la detección de especies. *Actas de las XI Jornadas*

Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y caprinotecnia.
Palencia 1986.

RECIO, I.; Molina, E.; Ramos, M.; Frutos de, M. 1995. Quantitative analysis of major whey proteins by capillary electrophoresis using uncoated capillaries. *Electrophoresis* 16:654.

RECIO, I.; Olieman, C. 1996. Determination of denatured serum proteins in the casein fraction of heat-treated milk by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 17:1228.

RECIO, I.; Amigo, L.; López-Fandiño, R. 1997. Assessment of the quality of dairy products by capillary electrophoresis of milk proteins. *J. Chromatogr. B.* (In press).

REITER, B.; Sorokin, Y.; Pickering, A.; Hall, A.J. 1969. Hydrolysis of fat and protein in small cheeses made under aseptic conditions. *J. Dairy Res.* 36:65.

REVILLE, W.J.; FOX, P.F. 1978. Soluble protein in Cheddar cheese: a comparison of analytical methods. *Irish. J. Food Sci. Tech.* 2:67.

RISPOLI, S.; Saugues, R. 1989. Isoélectrofocalisation des lactosérums de fromages de mélange brebis-vache sur gel de polyacrilamide. Application à la recherche et au dosage du lait de vache dans les fromages de brebis. *Lait* 69:211.

RISPOLI, S.; Rivemale, M.; Saugues, R. 1991. Mise en évidence et évaluation de la quantité de lait de vache dans les fromages de brebis par isoélectrofocalisation des lactosérums. Application au cas de fromages très protéolysés: fromages type Roquefort. *Lait* 71:501.

- RODRÍGUEZ, F.; Juárez, M. 1995. Técnicas analíticas para garantizar la calidad de los productos lácteos. *Rev. Esp. Lechería* 3:30
- RODRÍGUEZ, E.; Martín, R.; García, T.; Hernández, P.E. y Sanz, B. 1990. Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Dairy Res.* 57:197.
- RODRÍGUEZ, E.; Martín, R.; García, T.; González, I.; Morales, P.; Sanz, B. y Hernández, P. 1991. Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Sci. Food. Agric.* 61:1715.
- ROUDOT-ALGARON, F. 1996. Le goût des acides aminés, des peptides et des protéines: exemple de peptides sapides dans les hydrolysats de caséines. *Lait*, 76:313.
- SALLES, C.; Septier, S.; Roudot-Algaron, F.; Guillot, A.; Etiévant, P.X. 1995. Sensory and chemical analysis of fractions obtained by gel permeation of water-soluble comté cheese extracts. *J. Agric. Food. Chem.* 43:1659.
- SEIBERT, B.; Erhardt, G.; Senft, B. 1985. Procedure for simultaneous phenotyping of genetic variants in cow's milk by using isoelectric focusing. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.*, 16:183.
- SEKULIT, S.; Seasholtz, M.B.; Wang, Z.; Kowalski, B.R. 1993. Nonlinear Multivariate Calibration Methods in Analytical Chemistry. *Anal. Chem.* 65(19):835A.
- SHARAF, M.A.; Illman, D.L.; Kowalski, B.R. 1986. *Chemometrics*. John Wiley & Sons, New York.

STRANGE, E.D.; Malin, E.L.; Van Hekken, D.L.; Basch, J.J. 1992. Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins. *J. Chromatogr. A* 624:81.

STRICKLAND, M.; Weimer, B.C.; Broadbent, T.R. 1996. Capillary electrophoresis of Cheddar cheese. *J. Chromatogr. A* 731:305.

SWAISGOOD, H.E. 1992. Chemistry of caseins. En: P.F. Fox (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1. Proteins*. Elsevier Applied Science. Cambridge, pp. 63.

TORRE, M.; Cohen, M.E.; Corzo, N.; Rodríguez, M.A.; Diez-Masa, J.C. 1996. Perfusion liquid chromatography of whey proteins. *J. Chromatogr. A* 729:99.

TRIEU-CUOT, P.; Gripon, J.C. 1982. A study of proteolysis during Camembert cheese ripening using isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. *J. Dairy Res.* 49:501.

TSANG, V. C. W.; Peralta, J. M.; Simons, A. R. 1983. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. Page 377 in *Methods Enzymol.* Vol. 92. J. J. Langone and H Van Vunakis, ed. Academic Press, New York, NY.

UNSCRABLER USER'S GUIDE. 1994. Camo A/S. Norway.

URBANKE, W.; Luf, W.; Brandl, E. 1992. Use of HPLC for control of the adulteration of milk and milk products of different species. *Z. Lebensm. Unters For.* 195:137.

VISSER, S. 1993. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavour: an overview. *J. Dairy Sci.* 76:329.

WALSTRA, P.; Jennes, R. 1984. Heating. En " Dairy Chemistry and Physics". De. John Wiley and Sons, New York. pp 162.

WEIHS, C. 1993. Multivariate Exploratory Data Analysis and Graphics: A Tutorial *J. Chemometr.* 7:305.

WINTER, A; Ek, K.; Anderson, V. 1977. Analytical electrofocusing in thin layers of polyacrilamide gels. Application Note 250. LKB-Producer AB, S6161 25, Bromma, Sweden.